



Irradiation par microfaisceau de particules alpha : Implication des espèces réactives de l'oxygène dans l'effet de voisinage.

Maïté Hanot

► To cite this version:

Maïté Hanot. Irradiation par microfaisceau de particules alpha : Implication des espèces réactives de l'oxygène dans l'effet de voisinage.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT : . tel-00429902

HAL Id: tel-00429902

<https://theses.hal.science/tel-00429902>

Submitted on 5 Nov 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DES SCIENCES PARIS-SUD

2008

No attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Ecole doctorale Rayonnements et Environnement
Spécialité : Radiobiologie

présentée et soutenue publiquement
par

Maïté Hanot

le 24 novembre 2008

**Irradiation par microfaisceau de
particules alpha : implication des
espèces réactives de l'oxygène dans
l'effet de voisinage.**

JURY

Philippe Moretto
Dietrich Averbeck

Claude Le Sech
Jean-Luc Ravanat

Claire Rodriguez-Lafrasse

Jaime F. Angulo Mora

Hicham Khodja

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Membre invité

Directeur de thèse

Encadrant

« Cherchons comme cherchent ceux qui doivent trouver et trouvons comme trouvent ceux qui doivent chercher encore. Celui qui est arrivé au terme ne fait que commencer. »

Saint Augustin

*Extrait de **De Ord***

Remerciements

Mon travail de thèse s'est déroulé au laboratoire Pierre Süe du Commissariat à l'énergie atomique de Saclay dans le cadre de l'école doctorale rayonnements et environnement. Cette thèse n'aurait vu le jour sans la persévérance et l'audace d'Hicham Khodja et Jaime F. Angulo-Mora qui ont cru en ce projet. Je les remercie d'avoir su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux. J'ai vraiment aimé travailler sur ce projet à l'interface entre deux domaines, la biologie et la physique. C'est une ouverture d'esprit et un vrai travail de composition.

J'adresse mes remerciements aux directeurs successifs du laboratoire Pierre Süe, Stéphane Lequien et Eric Eliot et j'adresse toute ma reconnaissance à Pascal Berger, directeur adjoint, qui a toujours été présent durant la transition.

Je remercie Dietrich Averbeck et Philippe Moretto de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Le regard critique, juste et avisé qu'ils ont porté sur mes travaux ne peut que m'encourager à être encore plus perspicace et engagée dans mes recherches. Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger mes travaux et y consacrer du temps malgré leurs nombreuses obligations.

J'ai eu la chance de rencontrer énormément de personnes au cours de ces trois années de thèse. J'aimerais exprimer ma gratitude envers ceux en qui j'ai trouvé un soutien, la difficulté de l'exercice tenant dans le fait de n'oublier personne. Faisons un tour d'horizon.

Pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale qui m'ont permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, je remercie chaudement l'ensemble des membres de mon équipe, passés et présents. Je pense à Jim Hoarau qui a toujours été disponible pour affronter les problèmes et à Laurent Daudin qui a tout fait pour que ça marche ! Je remercie mes collègues de bureau Jean-Paul Gallien et Franco Pontiggia pour les moments de détente autour d'un café et Caroline Raepsaet qui a grandement participé à l'élaboration de ma forêt vierge. Merci à Yvan-Pierre Kilisky qui m'a permis d'accélérer le rythme des dernières manip' et aussi à François Saillant (j'adore tes blagues) et Didier Guillier qui m'ont toujours aidé spontanément quand j'en avais besoin. Je garde aussi une pensée pour Marc Billon et Pascal Lhénoret. La dernière année de thèse n'aurait pas été la même sans la présence dynamique de Stéphanie Sorieul et Yves Papon. Je n'oublie pas Dorianne Pognant qui m'a permis de partager ce travail.

J'ai aussi eu la chance de travailler avec d'autres équipes. Au quotidien, l'équipe toxicologie humaine et expérimentale du laboratoire Pierre Süe, initialement sous la direction de Barbara Gouget, m'a énormément apportée. Je remercie Marie Carrière, qui soutient l'équipe aujourd'hui, de toujours avoir laissé sa porte ouverte. Merci aux différents membres de l'équipe, encore une fois passés et présents : Céline, Laure, Estelle, Sarah, Angélique, Guillaume, Sabrina, Julien et Sylvain.

Je remercie généreusement l'équipe du laboratoire de génétique de la radiosensibilité du

CEA de Fontenay aux roses (Philippe, Oscar, Laurent, Germain et Denis) de m'avoir accueilli pour de brèves manip'. Un gros merci à Émilie Renaud tout particulièrement.

Merci à Virginie Escriou de l'unité de Pharmacologie Chimique et Génétique de l'université Paris Descartes pour son partage d'expérience et son aide généreuse sur des essais de transfection.

Merci à Jean-Marc Verbavatz de l'iBiTec-S (Équipe Imagerie cellulaire et moléculaire) qui m'a gracieusement permis d'accéder à un microscope Zeiss, tout équipé. Ce microscope m'a énormément apporté : de magnifiques images et mes premiers résultats.

Je remercie de plus tous les auteurs des programmes du domaine public que j'ai utilisés intensément durant cette thèse, à savoir tous les contributeurs de ImageJ, L^AT_EX et JabRef.

« Faire une thèse » est une échappée solitaire au milieu de compagnons de fortune (ou d'infortune). Je remercie Angélique Simon, Judith Monnier et Guillaume Untereiner. Je regretterai les moments que l'on a passés dans le club de soutien des doctorants 2008 ! Je garde aussi une pensée pour tous les doctorants du Pierre Süe passés (Estelle, Sarah, Charlotte, Céline, Anne-Marie. . .) et futurs (Maxime et le lancé de tête, Mandana, Stéphanie. . .).

Mais mon quotidien n'aurait pas été le même sans les membres du laboratoire qu'on croise dans les couloirs, qui partagent un café et de bons moments. Particulièrement, je pense à Christian Bettoni qui est la personne la plus avenante que j'ai rencontré. Merci à Hervé Martin (l'expert info), Clarisse, Jean-Louis (et ses moments bleus), Eddy, Oulfa, Maxime. . .

Cela va de soi, je remercie évidemment ma famille, et belle famille, pour son irremplaçable et inconditionnel soutien. Le plus fort de mes remerciements est pour mes parents à qui je dois tout. Ils m'ont toujours suivi et encouragé, quoi que je décide de faire. Ils sont formidables. Un remerciement profond, et bien plus encore, pour Christophe. Merci de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières lignes de ce mémoire. En plus de me supporter dans des conditions « normales », ce qui n'est déjà pas une mince affaire je le conçois, il a du subir mes humeurs. Merci d'être là tous les jours.

Table des matières

Introduction et objectifs de la thèse
--

I État de l’art	5
------------------------	----------

Chapitre 1

Physique et chimie de l’absorption des radiations	7
--	----------

1.1	Les différents types de rayonnements ionisants	9
1.1.1	Rayonnements ionisants : définition	9
1.1.2	Les rayonnements électromagnétiques	10
1.1.3	Les rayonnements particuliers	11
1.2	Les unités de mesures associées aux rayonnements ionisants	13
1.3	L’absorption des radiations dans la matière	14
1.3.1	Radiations directement ou indirectement ionisantes	14
1.3.2	L’absorption des rayons X	15
1.3.3	L’absorption des neutrons	16
1.4	Chimie de l’absorption des radiations	17
1.4.1	Les effets directs et indirects des radiations	17
1.4.2	Les radicaux libres	18
1.4.3	Échelles de temps	19

Chapitre 2	
Effets biologiques des rayonnements ionisants	21
2.1 Les effets moléculaires et cellulaires des rayonnements ionisants	23
2.1.1 La structure de l'ADN	23
2.1.2 Les lésions radio-induites	24
2.2 Réponses cellulaires : activation des voies de signalisation	27
2.2.1 Les voies de contrôle du cycle cellulaire	27
2.2.2 Réparations des lésions de l'ADN	29
2.2.3 Le contrôle de la réponse apoptotique	35
2.3 Les effets non ciblés	38
2.3.1 Le paradigme conventionnel centré sur le dommage à ADN	38
2.3.2 Définition des effets non ciblés et retardés	39
2.4 Effet de voisinage et réponse biologique	41
2.4.1 Effet de voisinage et dommages à l'ADN	41
2.4.2 La régulation du cycle cellulaire dans les cellules bystander	43
2.4.3 Les EROs dans réponse au voisinage	43
2.4.4 Le rôle du calcium	46
2.4.5 La communication cellulaire	47
Chapitre 3	
Radiobiologie et microfaisceaux	51
3.1 (Micro)faisceaux et accélérateurs de particules	53
3.1.1 Domaines d'applications	53
3.1.2 Les accélérateurs linéaires	54
3.1.3 Les accélérateurs circulaires	55
3.2 L'impact des microfaisceaux en biologie des radiations	56
3.2.1 Les moyens d'irradiation à faible dose	56
3.2.2 Un intérêt grandissant pour les microfaisceaux	58
3.2.3 Les différentes installations	58
3.3 Conception des installations d'irradiation par microfaisceaux pour la radiobiologie	60
3.3.1 Description d'une installation type	60
3.3.2 La formation du faisceau	61
3.3.3 La mise à l'air du faisceau	62

3.3.4	Observation et Repérage des cellules	62
3.3.5	La numération des particules délivrées	64
3.3.6	Maintien d'échantillons biologiques	66

II	Matériels et Méthodes	71
-----------	------------------------------	-----------

Méthodologie

Principes et procédures

1	Irradiation par microfaisceau d'ions	75
1.1	La microsonde nucléaire	75
1.2	État de l'installation au début du projet de thèse	76
1.3	Protocole d'irradiation	78
1.4	Dispositif d'observation	80
1.5	Visualisation de l'impact des ions alpha à l'aide de détecteur plastique CR39	80
2	Biologie cellulaire	81
3	Évaluation de la viabilité cellulaire	83
4	Le test des micronoyaux	83
5	Immunodétection de dommages à l'ADN	85
6	Analyse du métabolisme oxydatif	86
6.1	CM-H2DCFDA	86
6.2	CMAC	87
6.3	DHR123	88
7	Analyse de l'apoptose par essai TUNEL	90
8	Etude du cycle cellulaire : Cytométrie en flux	91

III Résultats

93

Chapitre 1

Biocompatibilité et protocole d'irradiation

1.1	Microfaisceau et biocompatibilité	97
1.1.1	Identification des contraintes	97
1.1.2	Les boîtes de cultures	97
1.1.3	Les cultures cellulaires	99
1.1.4	Le maintien des cultures au sein de l'installation	103
1.1.5	Bilan	103
1.2	Établissement du protocole d'irradiation	103
1.2.1	Simulation de l'irradiation	103
1.2.2	Contrôle du nombre de particules	107
1.2.3	Visualisation des cellules	108
1.2.4	Repérage et enregistrement des positions	110
1.2.5	Position du collimateur et irradiation	112
1.2.6	Cellules ciblées ? cellules voisines ?	113
1.3	Conclusion	113

Chapitre 2

Caractérisation de la réponse de la population ciblée et voisine

2.1	Dynamique d'apparition des foyers de réparation des cassures double brin	117
2.2	Apoptose radio-induite	118
2.3	Le test des micronoyaux	119
2.3.1	Induction de micronoyaux dans la population globale	120
2.3.2	Induction de micronoyaux dans la population ciblée et voisine	121
2.3.3	La catastrophe mitotique	122
2.4	Conclusions	126

Chapitre 3

Métabolisme oxydatif et signalisation membranaire

3.1	Dynamique du métabolisme oxydatif suite à l'irradiation ciblée	129
3.1.1	Génération d'espèces radicalaires suite à l'irradiation	129
3.1.2	Défense cellulaire : le glutathion réduit	132
3.1.3	Conclusions	133
3.2	Implication de la signalisation membranaire	135
3.2.1	Signalisation de la membrane et génération d'EROs	135
3.2.2	Signalisation membranaire et induction des foyers de réparation des CDBs	136
3.2.3	Impact de la signalisation membranaire sur l'induction de mi- cronoyaux	137
3.2.4	Impact de la signalisation membranaire sur l'induction de la mort mitotique	137
3.2.5	Conclusions	140

IV Conclusions et discussion

141

Chapitre 1

Micro-irradiation et réponse cellulaire : les cellules MC3T3-E1

1.1	Cinétiques des évènements cellulaires suite à l'irradiation	145
1.1.1	La réponse des cellules voisines	145
1.1.2	Réponse des cellules ciblées et voisines : le bilan	146
1.2	L'implication des EROs dans l'effet de voisinage	146
1.3	L'effet de voisinage est observé dans les cellules <i>bystander</i> et les cellules ciblées	149
1.4	Implication de l'effet de voisinage dans les cellules ciblées	151
1.5	La notion de distance et l'effet de voisinage	152
1.6	Conclusion : l'effet de voisinage, une amplification de la réponse cellulaire	153

Chapitre 2

Irradiation par microfaisceau : la place du laboratoire Pierre Süe dans la communauté

Chapitre 3

Conclusion générale

Annexes	163
----------------	------------

Annexe A

Principe de la cytométrie en flux **165**

Annexe B

**Microsonde nucléaire :
techniques d'analyse et de caractérisation** **167**

Annexe C

Les Macros développées sous ImageJ pour l'analyse d'image **169**

- C.1 Analyse de forme et enregistrement de la région d'intérêt définie par
chaque objet 169
- C.2 Mesure de la fluorescence à partir d'une région d'intérêt 170

Bibliographie	171
----------------------	------------

Table des figures

1.1	Radioactivité et rayonnement.	9
1.2	Représentation schématique des évènements d'ionisation se produisant sur le parcours d'une particule en relation avec la courbe de Bragg.	14
1.3	Effet Compton (schéma adapté de Hall and Giaccia (2006)).	15
1.4	Effet photoélectrique (schéma adapté de Hall and Giaccia (2006)).	16
1.5	Effets direct et indirect des rayonnements.	17
2.1	La structure de l'ADN.	24
2.2	Conséquences biologiques des rayonnements ionisants.	25
2.3	Lésion radio-induites.	25
2.4	Cycle cellulaire d'une cellule eucaryote.	28
2.5	Régulation du cycle cellulaire	28
2.6	Base Excision Repair, d'après Hoeijmakers (2001).	32
2.7	Nucleotide Excision Repair.	33
2.8	Réparation des CDBs : NHEJ ou HR.	34
2.9	Signalisation de l'apoptose (www.biooncology.com).	36
2.10	Apoptose radio-induite.	37
2.11	Représentation schématique de l'instabilité génétique.	40
2.12	Évènements cellulaires impliqués dans la réponse <i>bystander</i>	45
2.13	Signalisations cellulaires hypothétiques dans les cellules <i>bytander</i>	45
2.14	Connexons formant une jonction de type gap.	47
2.15	L'effet de voisinage. Schématisé selon Morgan and Sowa (2005, 2007).	49
3.1	Représentations schématiques de l'utilisation de masques pour l'irradiation.	57
3.2	Représentation d'un système d'irradiation en co-culture.	57
3.3	État des installations produisant des microfaisceaux en 2002 et 2006.	59
3.4	Représentation schématique d'une installation d'irradiation par microfaisceau d'ion	61
3.5	Reconnaissance des cibles via microscopie par contraste de phase au SNAKE.	63
3.6	Reconstitution d'une image en microscopie en phase quantitative.	64
3.7	Exemples de systèmes de détection.	66
3.8	Support des cultures cellulaires au PTB.	67
3.9	Support des cultures cellulaire au sein de l'installation du JAERI.	67
3.10	Support des cultures cellulaire au sein de l'installation du LIPSION.	68

1	Schématisation de la réalisation des travaux de thèse représentant la méthodologie adoptée.	74
1	Présentation de la microsonde nucléaire et des lignes de faisceaux.	76
2	Microsonde nucléaire du laboratoire Pierre Süe (Crédit F. Vrignaud/CEA).	77
3	Mise en place de l'électroaimant et du microscope à fluorescence.	78
4	Étalonnage du système d'irradiation. Mesure de l'énergie des particules et du flux de particules.	79
5	Principe de l'immunofluorescence indirecte.	85
6	Test de spécificité de CMAC. Les cultures sont exposées à 1 μ M de BSO pendant 24 heures avant coloration avec la sonde CMAC à différentes concentrations.	89
1.1	Fenêtre en Si_3N_4	98
1.2	Schéma représentant la configuration en coupe transversale de la boîte de culture au sein de l'installation d'irradiation. Les échelles sont volontairement infidèles afin de mieux appréhender la géométrie du système.	99
1.3	Évolution des différentes modifications effectuées sur les boîtes de culture. Les dessins de définitions ont été réalisés par Jim Hoarau sur Autocad.	101
1.4	L'ensemencement des cultures pour l'irradiation par microfaisceau d'ions est réalisé avec l'aide d'un cylindre de clonage afin de limiter le dépôt des cellules au centre de la boîte.	102
1.5	Etude du cycle cellulaire des cellules MC3T3 à 80% de confluence.	102
1.6	Incubateur et chambre micro-environnementale.	104
1.7	Traversée de différents polymères.	105
1.8	Simulations Monte Carlo (SRIM2008).	106
1.9	Position relative des impacts des particules α sur un plastic CR39 comparativement à la position des noyaux.	108
1.10	Visualisation des cultures cellulaires.	109
1.11	Cytotoxicité du Hoechst 33342 couplé à l'éclairage UV.	110
1.12	Sélection des noyaux irradiés et repérage des populations ciblée et <i>bystander</i> . Les couleurs ont été ajoutée informatiquement.	111
2.1	Exemple d'immonodétection de γH2AX et 53BP1.	117
2.2	Cinétique d'induction des cassures double brin de l'ADN.	118
2.3	Apoptose radio-induite.	119
2.4	Le test de micronoyaux.	120
2.5	Induction micronoyaux dans la population totale suite à l'irradiation de différentes fractions de la population cellulaire.	120
2.6	Induction de micronoyaux dans la population ciblée et voisine suite à l'irradiation de différente fraction de la population cellulaire.	121
2.7	Cytométrie en flux et noyaux géants.	123
2.8	Caractérisation des noyaux géants.	124
2.9	Proportion de cellules à noyau géant suite à l'irradiation.	125
3.1	Évaluation du stress oxydant global suite à l'irradiation ciblée.	130

3.2	Évaluation du stress oxydant mitochondrial suite à l'irradiation ciblée. . .	131
3.3	Évaluation de la consommation du glutathion réduit intracellulaire suite à l'irradiation ciblée.	133
3.4	Signalisation de la membrane et génération d'EROs	135
3.5	Signalisation membranaire et induction des foyers de réparation des cassures double brin de l'ADN.	136
3.6	Influence du traitement des culture MC3T3 à la filipine sur l'induction de micronoyaux après irradiation par microfaisceau. (*, $p \leq 0,05$ est évalué par rapport aux contrôles, **, $p \leq 0,05$ est évalué par rapport aux mesures effectuées sans traitement à la filipine et dans les mêmes conditions expérimentales. Mesures effectuées sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines.)	138
3.7	Influence du traitement des cultures cellulaire MC3T3 à la filipine sur l'induction de caractéristiques de mort mitotique après irradiation par microfaisceau avec 10 particules α par noyau (*, $p \leq 0,05$ est évalué par rapport aux contrôles, **, $p \leq 0,05$ est évalué par rapport aux mesures effectuées sans traitement à la filipine et dans les mêmes conditions expérimentales. Mesures effectuées sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines.)	139
1.1	Représentation schématique de la cinétique des évènements cellulaires (entre 0 et 24h) suite à l'irradiation de 10% de la population cellulaire par microfaisceau de particules α (10 particules par cible).	147
1.2	L'incubation des cultures (cellules HeLa) en présence de filipine, inhibe l'induction de foyers 53BP1. Cas d'irradiation nucléaire de 5 cellules dans la population étudiée avec 1 particule α . D'après Tartier et al. (2007). . . .	148
1.3	Induction de foyers γ H2AX dans les cellules <i>bystander</i> , suite à l'irradiation aux rayons X (2 Gy). Il s'agit d'un système de co-cultures de cellules NHA et T98G. Un type cellulaire est irradié puis l'effet <i>bystander</i> est observé dans le second type cellulaire. D'après Burdak-Rothkamm et al. (2007). . .	148
1.4	Induction de micronoyaux dans une population où différentes fractions sont irradiées avec une particule α par cellule. Les carrés correspondent aux résultats expérimentaux et les cercles, aux prédictions sans effet de voisinage. D'après Shao et al. (2003c).	150
1.5	Sélection de 10% de la population cellulaire pour l'irradiation (cellules ciblées en bleu, cellules <i>bystander</i> en rose, les couleurs sont ajoutées informatiquement).	151
1.6	Induction de CDBs mesurée 30 minutes après irradiation α dans les cellules irradiées et <i>bystander</i> . D'après Hu et al. (2006).	153
A.1	La cytométrie en flux.	166

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATM	Ataxia telangectasia mutated (protéine)
ATR	ATM and Rad3-related protein (protéine)
BER	Base excision repair
BSO	Buthionine sulfoximine
CDB	Cassure double brin
CDK	Kinases cyclines-dépendantes
CMAC	7-amino-4-chloromethylcoumarin, sonde fluorescente pour la détection du glutathion réduit
CM-H2-DCFDA	5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, sonde fluorescente pour la détection des EROs
CSB	Cassure simple brin
DHR 123	dihydrorhodamine 123, sonde fluorescente pour la détection des EROs mitochondriales
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase (protéine)
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
GSH	Glutathion réduit
HR	Homologous recombinaison
IC50	Indice de cytotoxicité 50, indicateur mesurant la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population cellulaire.
IP	Iodure de propidium

Abréviations

NHEJ	Non homologous end joining recombinaison
NER	Nucleotide excision repair
PARP	poly(ADP-ribose) polymérase
SCE	Sister chromatide exchange
TEL	Transfert d'énergie linéique

Introduction et objectifs de la thèse

LA DÉCOUVERTE des rayons X en 1895 par Roentgen, celle du radium et du polonium par Pierre et Marie Curie en 1898 et la découverte de la radioactivité de l'uranium en 1896 par Becquerel, ont donné le signal de progrès qui ont révolutionné la physique et la médecine du XX^{me} siècle. En 1897, Thomson découvre l'électron à partir d'expériences effectuées sur l'ionisation des gaz. Il inaugure une voie qui conduit à la détermination de son rôle dans la matière et à l'électronique. Planck propose la mécanique quantique en 1903. Einstein établit l'équivalence matière-énergie en 1905 et ouvre la voie de l'énergie nucléaire. Il met en évidence, la même année, la double nature corpusculaire et ondulatoire des photons. La structure des atomes est avancée par Rutherford en 1912 à partir d'expériences effectuées à l'aide d'un faisceau de particules alpha dirigé contre une mince feuille d'or.

Le domaine médical a bénéficié très tôt de ces avancées scientifiques. La radiobiologie naît sous l'impulsion de Barthélémy et Oudin qui obtiennent la première radiographie en 1896. Science basée sur l'étude des effets des rayonnements et notamment des rayonnements ionisants sur les êtres vivants, aujourd'hui la radiobiologie s'étend aussi à l'étude des moyens de s'en préserver, des traitements à suivre en cas d'irradiation et de leur emploi pour procéder à des investigations dans le corps humain.

Les conséquences dramatiques des événements d'Hiroshima et Nagasaki en 1945 et la prise de conscience par l'opinion publique des potentialités de l'énergie nucléaire ont accéléré dans les années 1950 la mise en place de règles de radioprotection. Ces règles doivent assurer la protection du public et des travailleurs. Elles s'appliquent également au domaine médical dans le respect du rapport bénéfice/risque. Toutes ces normes évoluent au fil des progrès de la connaissance scientifique des effets biologiques des rayonnements.

Aujourd'hui, il est indéniable que des progrès considérables ont été réalisés sur la connaissance des risques liés aux rayonnements ionisants depuis la découverte de la radioactivité. En effet, les incertitudes se sont réduites ; nous avons actuellement des connaissances approfondies sur les effets des rayonnements à fortes doses et à doses moyennes. Cependant, pour la plage des faibles doses, l'incertitude demeure. Comprendre comment les rayonnements ionisants agissent lors de l'exposition à de faibles doses reste un enjeu majeur, particulièrement dans le cadre d'exposition environnementale notamment dû au radon (gaz émetteur de particules α dans les régions granitiques). Les faibles doses d'irradiation induisent l'apparition d'effets non ciblés. Mis en évidence au début des années 1990 par Nagasawa and Little (1992), ce concept d'effets non ciblés est lié à l'observation de

dommages dans des cellules non directement ciblées par l'irradiation mais voisines de cellules irradiées.

Appréhender ce concept passe par des études de radiobiologie à l'échelle cellulaire. C'est dans ce cadre que les faisceaux d'ions, d'abord développés pour des études de physique nucléaire et de physique des particules, se sont récemment avérés être des outils efficaces avec un fort potentiel pour l'investigation des mécanismes de réparation et de signalisation à l'échelle de la cellule. Ces faisceaux de taille micrométrique présentent une résolution spatiale inférieure à la taille d'une cellule, ce qui permet une irradiation ciblée. L'intérêt d'un dispositif de type microfaisceau pour mener des études de dommages radiologiques à l'échelle cellulaire est double. Tout d'abord, chaque cellule peut être irradiée individuellement, parfois en ciblant uniquement certains compartiments cellulaires (noyau ou cytoplasme). Ensuite, un nombre de particules prédéterminé peut être délivré sur cible, ce qui permet par conséquent de maîtriser parfaitement la dose déposée.

Les travaux effectués au cours de cette thèse sont réalisés dans le cadre du développement d'une plateforme d'irradiation par microfaisceau d'ions dédiée à la radiobiologie au Laboratoire Pierre Süe du CEA de Saclay. Cette étude se place donc à l'interface entre deux domaines, la physique et la biologie, ce qui conditionne le double objectif de ces travaux.

L'objectif premier consiste à élaborer une plateforme d'irradiation biocompatible, c'est-à-dire favorisant de façon optimale la pratique de la biologie cellulaire au sein de l'installation. Les conditions expérimentales pour la réalisation d'irradiations ciblées doivent être définies de façon à ce que la plateforme fonctionne en routine. Le second objectif se place plus particulièrement dans le contexte radiobiologique avec l'utilisation de la plateforme d'irradiation. Il s'agit d'étudier la réponse au voisinage de cultures cellulaires suite à l'irradiation ciblée de particules α . Plus particulièrement, les événements induisant la génération d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules ciblées et voisines seront étudiés.

Ce mémoire se décompose en quatre parties dont la première expose la nature des rayonnements ionisants et la conséquence de leur absorption dans la matière vivante. Cette première partie se veut la plus complète possible, rassemblant le domaine de la physique et de la biologie afin de rendre la thématique abordée accessible à tout lecteur. La problématique liée à l'étude des effets non ciblés et particulièrement l'effet de voisinage sera abordée par la suite. Les processus biologiques mis en jeu et les implications des microfaisceaux d'ions dans cette thématique seront notamment approfondis.

La méthodologie, les techniques et les procédures mises en places lors de ces travaux font l'objet de la deuxième partie du mémoire. L'ensemble des protocoles mis en place ont nécessité une adaptation particulière pour permettre une analyse cellule à cellule.

Ensuite, afin de répondre au double objectif des travaux de la thèse, la troisième partie développe les résultats obtenus. Une grande partie du travail est consacrée au développement de la plateforme en terme de biocompatibilité puis à la définition des conditions expérimentales. Au sein de l'installation, la détermination des choix expérimentaux pour

la reconnaissance et l'enregistrement des coordonnées des cibles avant et après irradiation est une étape indispensable afin d'identifier la population cellulaire ciblée et voisine.

Cette étude est réalisée sur une lignée normale ostéoblastique nommée MC3T3-E1. Le choix de la lignée cellulaire utilisée pour cette étude a été établi dans le cadre d'une collaboration développée avec l'équipe *Toxicologie Humaine et Environnementale* du laboratoire Pierre Süe dont une partie des travaux consiste à étudier la toxicologie des matériaux issus du nucléaire et notamment l'uranium (pour référence, thèse de Milgram, 2008). L'uranium est un métal lourd ayant à la fois une toxicité chimique et radiologique. Lors d'une contamination interne, l'uranium se fixe au niveau d'organes cibles tels que le foie ou les os. Dans les os, l'uranium est internalisé à la place du calcium et peut donc être stocké plusieurs dizaines d'années. L'utilisation du microfaisceau d'ions permettant une irradiation ciblée autoriserait, à long terme, la mise en place d'études établissant l'importance de la toxicité radiologique de l'uranium dans la survenue de cancers osseux.

Dans le cadre de cette thèse, les travaux menés sur la lignée MC3T3-E1 consistent dans un premier temps à caractériser la réponse cellulaire suite à l'irradiation par microfaisceau de particules α , et ce afin de mettre ou non en évidence une réponse au voisinage dans les conditions expérimentales précédemment établies. La caractérisation de la réponse cellulaire est basée sur l'observation de dommages à l'ADN ou de la survenue de mort cellulaire.

Enfin, l'implication des espèces réactives de l'oxygène est étudiée par le biais de techniques d'observations directes dans les deux populations cellulaires ciblées et voisines identifiées. Ces travaux portant sur la réponse cellulaire suite à l'irradiation ciblée sont basées sur l'établissement d'une cinétique comparative entre les différents événements cellulaires mis en évidence.

L'ensemble, discuté dans la dernière partie de ce mémoire, vise à mieux comprendre l'effet de voisinage lié à l'irradiation à faible dose d'irradiation.

Première partie

État de l'art

Physique et chimie de l'absorption des radiations

Sommaire

1.1	Les différents types de rayonnements ionisants	9
1.1.1	Rayonnements ionisants : définition	9
1.1.2	Les rayonnements électromagnétiques	10
1.1.3	Les rayonnements particuliers	11
1.2	Les unités de mesures associées aux rayonnements ionisants	13
1.3	L'absorption des radiations dans la matière	14
1.3.1	Radiations directement ou indirectement ionisantes	14
1.3.2	L'absorption des rayons X	15
1.3.3	L'absorption des neutrons	16
1.4	Chimie de l'absorption des radiations	17
1.4.1	Les effets directs et indirects des radiations	17
1.4.2	Les radicaux libres	18
1.4.3	Échelles de temps	19

LE PREMIER CHAPITRE définit et présente les radiations ionisantes en fonction de leur nature physique et des conséquences chimiques de leur absorption dans la matière vivante. Ceci permet d'appréhender la nature même des rayonnements et de préciser les notions de mesures qui leur sont associées. Cette physico-chimie des radiations est remise dans un contexte sociétal tel que l'utilisation des rayonnements en médecine, que se soit pour le diagnostic ou la thérapie.

1.1 Les différents types de rayonnements ionisants

1.1.1 Rayonnements ionisants : définition

Les rayonnements ionisants trouvent leur origine dans un phénomène physique naturel : la **radioactivité**. La radioactivité est définie par l'émission d'énergie résultant de la transformation d'un noyau instable vers un état stable. Cette transformation en un ou plusieurs noyaux va s'accompagner de l'élimination de l'énergie excédentaire sous forme de rayonnements de différents types (voir figure 1.1) : particules α , électrons (β) ou photons (rayons X ou γ).

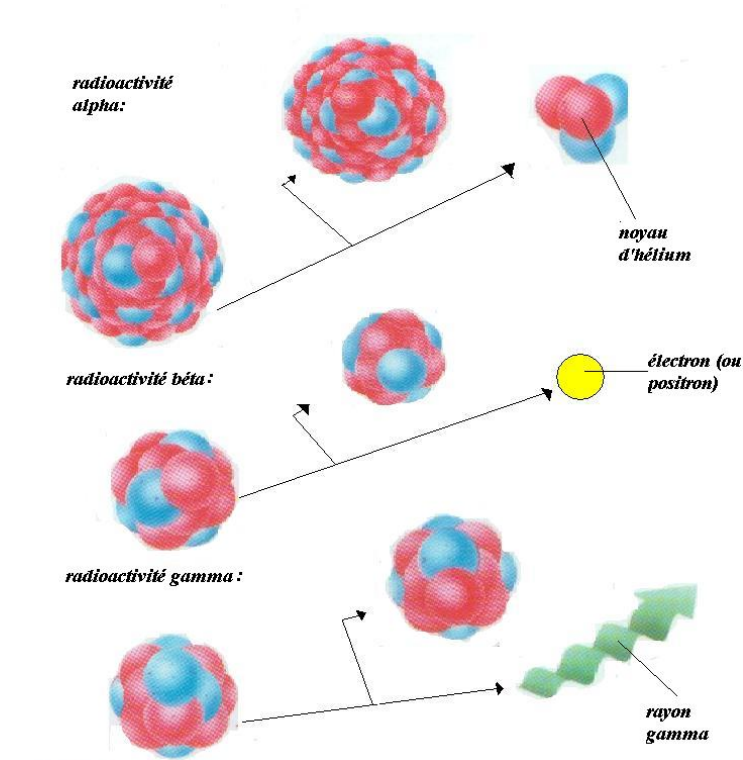


FIGURE 1.1 – La radioactivité correspond à la faculté que possèdent certains éléments à se transformer spontanément en un autre élément par désintégration du noyau atomique avec émission de particules alpha ou bêta ou rayonnements électromagnétiques appelés rayons X et rayons gamma (figure adaptée de www.andra.fr).

L'**absorption de l'énergie** des radiations dans la matière, et notamment la matière biologique, peut conduire à deux types de réactions : l'excitation ou l'ionisation de la matière. L'**excitation** se produit lorsque un électron de l'atome ou de la molécule s'élève à une énergie supérieure sans pour autant être éjecté. Par contre, si les radiations ont une énergie suffisante pour éjecter un ou plusieurs de ces électrons, il s'agit de l'**ionisation** ; ce type de radiation est donc appelée « **radiation ionisante** ».

Une caractéristique importante de ces radiations ionisantes est le relargage conséquent et localisé d'énergie. En effet, l'énergie dissipée par évènement de ionisation dans l'air est d'environ 33 eV, ce qui est largement suffisant pour entraîner la cassure d'une liaison chimique de forte énergie telle qu'une liaison carbone-carbone par exemple dont l'énergie de liaison est de 4,9 eV.

De façon usuelle, les rayonnements ionisants sont classés comme étant soit électromagnétiques, soit particuliers. Ces deux catégories de rayonnements sont développées ci-dessous.

1.1.2 Les rayonnements électromagnétiques

La majorité des expérimentations sur systèmes biologiques implique les rayons X ou γ , deux formes de radiations électromagnétiques.

Ces deux rayonnements sont de même nature et présentent les mêmes propriétés ; la désignation X ou γ reflétant simplement la façon dont ils sont produits (les rayons X sont produits de façon extranucléaire tandis que les rayons γ , de façon intranucléaire).

En termes pratiques, ceci signifie que les rayons X sont produits par de grands instruments, accélérant les électrons à de hautes vitesses, puis les stoppant ensuite brutalement par impact sur une cible constituée généralement d'or ou de tungstène ; une partie de l'énergie cinétique des électrons est alors convertie en rayons X. Les électrons du faisceau peuvent également interagir avec le champ coulombien du noyau des atomes et être déviés et freinés, en émettant des rayons X caractéristiques (rayonnement de freinage ou Bremsstrahlung). Les rayons γ , quant à eux, sont émis par des isotopes radioactifs ; ils véhiculent l'excès d'énergie cédé lors de la scission du noyau instable pour atteindre un niveau d'énergie stable. Ces rayonnements étant de même nature, tout ce qui est exposé dans ce chapitre au sujet des rayons X est aussi valable pour les rayons γ .

Les rayons X peuvent être considérés selon deux points de vue distincts. Le premier point de vue les décrit comme étant constitués d'ondes électriques et magnétiques ; les champs électrique et magnétique sont plans et disposés à angle droit l'un de l'autre. Les ondes se déplacent avec une vitesse c qui, dans le vide, a une valeur de 3.10^{10} cm.s⁻¹. La distance entre deux pics successifs de l'onde correspond à la longueur d'onde λ et le nombre de vagues passant à un point fixe par seconde décrit la fréquence ν . Le produit de la fréquence et de la longueur d'onde donne la vitesse de l'onde ; $\lambda \times \nu = c$.

Comme les rayons X, les ondes radio, radar et la lumière visible sont aussi des radiations électromagnétiques. Ils ont tous la même vitesse c , mais ont différentes longueurs d'ondes et donc différentes fréquences. Pour exemple, une onde radio peut avoir comme distance inter-pic une longueur de 300 mètres, alors que cette même distance est d'environ 500

millième de centimètre ($5 \cdot 10^{-5}$ cm) pour la lumière visible. La longueur d'onde des rayons X, quant à elle, est d'environ 100 milliardième de centimètre (10^{-8} cm). Ainsi, les rayons X et γ occupent dans le spectre électromagnétique, la place des plus courtes longueurs d'onde.

L'autre point de vue consiste à considérer les rayons X et autres rayonnements électromagnétiques comme étant des particules d'énergie. Chacune de ces particules contient une quantité d'énergie (E) égale à $h\nu$, où h est la constante de Planck et ν , la fréquence. Si un rayonnement a une grande longueur d'onde et donc une faible fréquence, alors l'énergie par photon est proportionnellement petite. Et inversement, si une radiation donnée a une courte longueur d'onde et donc une grande fréquence, alors l'énergie par photon est grande. Cette relation numérique entre énergie de photon (exprimé en kiloelectron volts¹) et la longueur d'onde (en angströms²) s'exprime de la façon suivante :

$$\lambda(\text{\AA}) = \frac{12,4}{E(\text{KeV})}$$

Par exemple, des rayons X d'une longueur d'onde de 0,1 Å correspondent à une énergie de 124 KeV.

Ce concept des rayons X considérés comme composés de photons est très important en radiobiologie. En effet, l'énergie des rayons X déposée dans les tissus ou les cellules est quantifiée à partir de l'énergie des photons.

1.1.3 Les rayonnements particuliers

Les autres types de rayonnements aussi utilisés expérimentalement correspondent aux électrons, aux protons, aux particules α , aux neutrons et aux ions lourds chargés. Certains sont déjà utilisés en radiothérapie.

Les électrons sont petits, chargés négativement, et peuvent être accélérés à haute énergie, à une vitesse proche de la vitesse de la lumière à l'aide de grands instruments tels que les bêtatrons, ou des accélérateurs linéaires. Les électrons sont largement utilisés en thérapie anticancéreuse.

Les protons sont chargés positivement et sont relativement massifs (leur masse est approximativement 2000 fois plus grande que celle des électrons). A cause de leur masse, leur utilisation pour le traitement des cancers requiert des équipements spécialisés, tels que des accélérateurs de particules ou cyclotrons, pour les accélérer à une énergie suffisante, mais ils sont tout de même utilisés en thérapie anticancéreuse dans des établissements très spécialisés ; il s'agit de la protonthérapie. Dans la nature, la Terre, protégée par l'atmosphère et le champ magnétique qui l'entoure, reste

1. Le kiloelectron volt (KeV) est une unité d'énergie correspondant à l'énergie possédée par un électron ayant été accéléré à 1000 volts.

2. l'angström (Å) est une unité de longueur correspondant à 10^{-8} cm.

néanmoins exposée à un rayonnement de protons provenant du soleil. Les protons représentent un danger majeur pour les astronautes en missions longue durée dans l'espace.

Les particules α correspondent à un noyau d'hélium et sont donc constituées de deux protons et deux neutrons. Ces particules sont chargées positivement et peuvent être accélérées par le même type d'équipement que les protons. Les particules α sont émises naturellement par la désintégration de radionucléides lourds tels que l'uranium ou le radium. Elles sont responsables de la majorité du rayonnement naturel auquel sont exposées en général les populations, et représentent un danger de plus en plus pris en considération dans les régions granitiques où le radon, issu de la désintégration du radium, est le plus présent. L'exposition au radon et à ses produits de filiation représente environ la moitié de l'exposition naturelle, avec des niveaux variables de la dizaine à plusieurs centaines de Bq/m³ selon les pays, les conditions locales, les environnements professionnels ou domestiques. Le principal risque pour la santé est celui de cancer du poumon, dont la fréquence est augmentée dans certains groupes exposés comme les mineurs d'uranium.

Bien que l'efficacité biologique des particules α soit 5 à 10 fois supérieure à celle des rayons X et γ , leur pénétration faible (elles ne traversent pas une feuille de papier) ne permet pas de les utiliser en clinique. On utilise par exemple le rayonnement α dans les détecteurs de fumée des systèmes d'alarme incendie automatique.

Les neutrons sont des particules ayant une masse similaire à celle des protons, mais ne portent pas de charge. Du fait de leur neutralité, il ne peuvent pas être accélérés par des accélérateurs de particules. Les neutrons sont produits lorsqu'une particule chargée, comme un deutéron (noyau de deutérium), est accélérée à une énergie suffisamment grande, puis est projetée sur une cible. De même ils sont les sous-produits de réaction lorsqu'un atome radioactif lourd entre en fission, formant alors deux atomes plus petits. En conséquence, les neutrons sont présents en large quantité dans les réacteurs nucléaires mais sont aussi parfois émis par quelques radionucléides artificiels. Les neutrons constituent une très grande partie des radiations spatiales, et ont une contribution significative à l'exposition des passagers et équipages des longs courriers.

Les ions lourds chargés sont des noyaux de différents éléments tels que le carbone, le néon, l'argon ou même le fer, qui sont positivement chargés car une partie ou la totalité de leurs électrons ont été arrachés. Pour être utilisés en radiothérapie, comme dans le cas d'hadronthérapie utilisant le carbone, ils doivent être accélérés à une énergie de l'ordre de la centaine de millions de volts et sont donc produits par quelques équipements très spécialisés.

1.2 Les unités de mesures associées aux rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants décrits ci-dessus ayant des propriétés physiques différentes, des paramètres ont été introduits afin de les caractériser. Il s'agit de la dose absorbée et du transfert d'énergie linéique. La dernière définition concerne le pouvoir d'arrêt des rayonnements.

La dose absorbée est la quantité d'énergie communiquée par le rayonnement à la matière traversée par unité de masse. Elle se mesure en Gray (Gy) représentant 1 joule déposé dans un kg de matière (anciennement le rad : $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$).

Dans des milieux vivants, une dose égale déposée par différents types de radiations n'aura pas le même effet biologique. Un Gray déposé par des particules α produit par exemple plus de dégâts qu'un Gray déposé par des photons X, la différence provenant notamment de la géométrie du dépôt d'énergie à l'échelle microscopique. Lors d'irradiations de cellules en culture, cette grandeur est utilisée pour établir les relations dose-effet.

Le transfert d'énergie linéique (TEL) a été introduit afin de rendre compte de la distribution spatiale des ionisations. Il permet de caractériser la qualité d'un rayonnement par un nombre sans avoir à décrire le type de particule et son énergie. Le TEL est défini comme étant égal à la quantité d'énergie cédée par un rayonnement lorsqu'il parcourt une distance dx et s'exprime en eV par micromètre ($\text{eV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$).

$$TEL = -\frac{dE}{dx}$$

Le TEL est d'autant plus grand que la particule perd beaucoup d'énergie sur une courte distance ; les ionisations provoquées par le passage d'une particule à bas TEL seront donc beaucoup plus éparées que les ionisations provoquées par une particule à haut TEL. Le TEL augmente linéairement avec la densité du milieu et, pour un milieu donné, il croît comme le carré de la charge de la particule et est inversement proportionnel à son énergie cinétique (Ferradini, 1983).

Pouvoir d'arrêt et parcours. Le pouvoir d'arrêt dépend du type de particule, de son énergie et des propriétés de la matière traversée. Car la production d'une paire d'ions (typiquement un ion positif et un électron) requiert une quantité fixe d'énergie (à peu près 33 eV dans l'air), la densité d'ionisation est proportionnelle au pouvoir d'arrêt du matériau.

Le pouvoir d'arrêt mesure une propriété du matériau, tandis que la perte d'énergie par cm considère la situation du point de vue de la particule. Mais la valeur et les unités sont les mêmes :

$$S(E) = -\frac{dE}{dx}$$

où dE est l'énergie, dx est la distance parcourue et $S(E)$, la réciproque du pouvoir d'arrêt. Le pouvoir d'arrêt, et par conséquent la densité d'ionisation, croissent

normalement avec la décélération : c'est la courbe Bragg, nommée d'après William Henry Bragg. Un peu avant la fin du parcours, la perte d'énergie passe par un maximum, le pic de Bragg. Ce pic est primordial en radiothérapie (pour mieux cibler les tumeurs).

Le parcours moyen d'une particule peut donc être calculé en intégrant la réciproque du pouvoir d'arrêt $S(E)$ sur la quantité d'énergie.

Seule l'absorption de photons n'est pas décrite par le pouvoir d'arrêt, mais par un coefficient d'absorption car le photon ne perd pas son énergie progressivement par des ionisations successives. Il perd souvent toute son énergie en une seule ionisation.

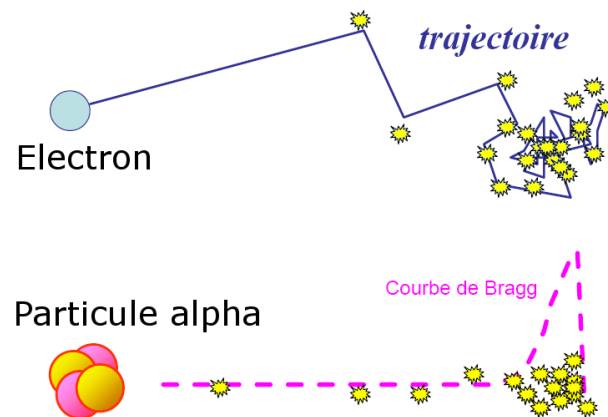


FIGURE 1.2 – Représentation schématique des événements d'ionisation se produisant sur le parcours d'une particule en relation avec la courbe de Bragg.

1.3 L'absorption des radiations dans la matière

1.3.1 Radiations directement ou indirectement ionisantes

Les radiations peuvent être aussi classées selon le fait qu'elles soient directement ou indirectement ionisantes. Toutes les particules chargées citées ci-dessus sont **directement ionisantes** ; c'est-à-dire, sous réserve qu'une particule individuelle ait suffisamment d'énergie cinétique, que ces particules peuvent casser la structure atomique de la matière à travers laquelle elles passent directement et produisent des changements chimiques et biologiques.

A contrario, les rayonnements électromagnétiques et les neutrons sont **indirectement ionisants**. Ils ne produisent pas de dommages chimiques ou biologiques par eux-mêmes. Les dommages apparaissent suite à leur absorption dans la matière qu'ils traversent. Dans ce cas, ils déposent leur énergie le long de leur trajectoire, produisant de nouvelles particules chargées capables de déplacements rapides et de produire des dommages. La majeure partie des ions formés provient, en réalité, de ces particules mises en mouvement et non pas des rayonnements eux-mêmes.

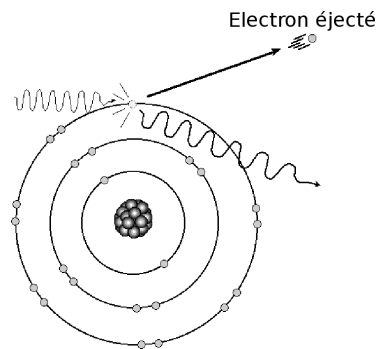
1.3.2 L'absorption des rayons X

Le processus par lequel les rayons X sont absorbés par la matière dépend de l'énergie des photons et de la composition chimique de la matière avec laquelle ils interagissent.

A hautes énergies, caractéristiques des irradiateurs linéaires ou équipés en Cobalt-60 pour la radiothérapie, l'**effet Compton** domine. Au cours de ce processus, les photons interagissent avec un électron considéré comme libre car son énergie de liaison est négligeable comparativement à l'énergie du photon (figure 1.3).

Une partie de l'énergie du photon est transférée à l'électron sous forme d'énergie cinétique ; le photon ainsi défléchi de sa trajectoire initiale continue son chemin et peut à nouveau, avec l'énergie résiduelle, entrer en collision avec un nouvel électron. La fraction d'énergie perdue par le photon lors d'une collision peut varier entre 0 et 80%.

FIGURE 1.3 – Effet Compton (schéma adapté de Hall and Giaccia (2006)).



Lors d'une irradiation de tissus par un faisceau de rayons X, résultent de ce type d'interaction de nombreux électrons accélérés, chacun capable d'ioniser d'autres atomes et pouvant aboutir à la cassure de liaisons chimiques et d'initier ainsi une cascade d'événements multiples conduisant à l'apparition de dommages biologiques.

Les photons de basses énergies vont quant à eux interagir avec la matière *via* l'**effet photoélectrique**. Au cours de ce processus, les photons interagissent avec un électron lié, par exemple un électron présent sur la couche K, L ou M d'un atome (figure 1.4 page suivante). Le photon transfère alors totalement son énergie à l'électron ; une partie de cette énergie permet d'arracher l'électron de l'atome et l'énergie résiduelle est transférée à l'électron sous forme d'énergie cinétique.

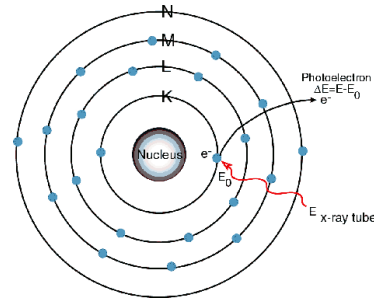
L'énergie cinétique (E) de l'électron éjecté peut s'exprimer de la façon suivante :

$$E = h\nu - E_0$$

où $h\nu$ est l'énergie du photon incident et E_0 , l'énergie de liaison de l'électron à son orbite.

Le trou laissé par l'éjection de l'électron de son orbite peut alors être comblé par un électron provenant d'une couche plus externe de l'atome ou peut aussi provenir de l'extérieur de l'atome. Le mouvement d'électron d'une couche à l'autre représente un changement

FIGURE 1.4 – Effet photoélectrique (schéma adapté de Hall and Giaccia (2006)).



d'état d'énergie. Cette variation d'énergie est compensée par l'émission d'un photon dont l'énergie est caractéristique. Dans les tissus mous, cette radiation caractéristique a une énergie très faible, typiquement 0,5 keV, et ne provoque aucune conséquence biologique.

La considération des processus d'absorption Compton ou photoélectrique est importante pour l'application médicale des rayons X pour le diagnostic ou la thérapie. Le coefficient d'absorption de masse, pour l'effet Compton est indépendant du numéro atomique de la matière absorbante. Au contraire, pour l'effet photoélectrique, ce coefficient varie rapidement avec le numéro atomique Z , et ce d'un facteur Z^3 .

Pour le diagnostic en radiologie, la gamme d'énergie des photons utilisés provoque à la fois des absorptions de type Compton et photoélectrique. Ces derniers sont en proportion majoritaire. Comme l'absorption dépend en partie du Z , certains tissus à haut Z vont présenter une absorption beaucoup plus importante que d'autres, c'est le cas notamment des os riches en calcium, ce qui permet d'obtenir une image reflétant ces différences d'absorption. En radiothérapie, seules les hautes énergies sont utilisées afin de favoriser l'effet Compton. Ceci permet un contrôle de la dose absorbée, alors identique pour chaque type de tissu.

1.3.3 L'absorption des neutrons

Les neutrons sont des particules neutres. De ce fait, elles sont particulièrement pénétrantes dans la matière comparativement à des particules chargées de même masse et énergie. Ce sont des particules indirectement ionisantes et leur interaction avec la matière est dite soit élastique soit inélastique.

Les neutrons diffèrent drastiquement des rayons X dans leur mode d'interaction avec les tissus. En effet, les neutrons interagissent directement avec le noyau des atomes de la matière ce qui provoque la mise en mouvement de différentes particules (protons, particules α , fragments de noyau).

La collision élastique est le processus dominant pour des neutrons d'énergie intermédiaire. Lors de la collision entre le neutron et un noyau, le neutron transfère une partie de son énergie cinétique au noyau. Le neutron, dévié par la collision, continue son chemin avec l'énergie résiduelle.

Dans les tissus mous, ce type d'interaction est dominant, particulièrement avec l'atome d'hydrogène. Ceci s'explique par le fait que l'hydrogène est particulièrement abondant dans ces tissus et que l'hydrogène et les neutrons ont une masse similaire.

Pour des neutrons d'une énergie supérieure à 6 MeV, la collision de type inélastique devient dominante, leur propension augmentant avec l'énergie. Dans ce cas, les neutrons peuvent interagir avec des atomes plus gros, comme le carbone ou l'oxygène, la collision produisant jusqu'à 4 particules α , nommées produit de spallation. Biologiquement ce phénomène a des conséquences d'autant plus importantes que l'énergie des neutrons incident est élevée.

1.4 Chimie de l'absorption des radiations

Après avoir évoqué la nature des rayonnements auxquels notre organisme est soumis, et la façon dont ils interagissent avec la matière, nous allons maintenant présenter les conséquences chimiques de ces interactions.

1.4.1 Les effets directs et indirects des radiations

Les effets chimiques des rayonnements ionisants et leurs conséquences biologiques résultent principalement des dommages causés sur la molécule d'ADN, cible critique. Quelque soit la nature du rayonnement, l'interaction avec le milieu biologique peut conduire à une lésion directe de cette molécule. En effet, les atomes de la molécule d'ADN peuvent directement être ionisés ou excités initiant ainsi une cascade d'évènements conduisant à un effet biologique. Considéré comme l'**effet direct** des radiations (voir figure 1.5), ce processus est dominant en ce qui concerne les radiations à haut TEL tels que les neutrons ou les particules α .

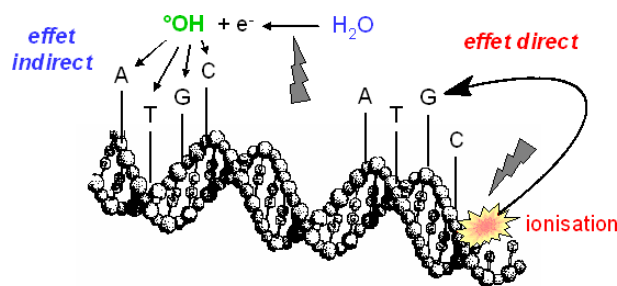


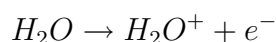
FIGURE 1.5 – Effets direct et indirect des rayonnements.

Alternativement, les radiations peuvent interagir avec d'autres atomes ou molécules de la cellule, particulièrement la **molécule d'eau** présente majoritairement en milieu biologique, produisant des radicaux libres, capables de diffuser suffisamment loin pour atteindre et endommager d'autres molécules dont l'ADN. Il s'agit de l'**effet indirect** des radiations (voir figure 1.5).

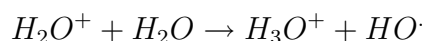
1.4.2 Les radicaux libres

Un **radical libre** est un atome ou une molécule portant un électron orbital non apparié sur sa couche externe. Cet état est associé avec un haut degré de **réactivité chimique**. Comme la cellule est composée de 80% d'eau, l'effet indirect des radiations est considéré avec beaucoup d'importance (Ferradini, 1983).

Le résultat de l'interaction entre photons ou particules chargées, telles que les électrons ou les protons, produit l'ionisation de l'eau, qui peut être exprimée comme suit :



H_2O^+ est un **ion radicalaire**. En effet, H_2O^+ est chargé et contient un électron non apparié ; par conséquent, il est à la fois ion et radical libre. Les ions radicalaires ont une durée de vie extrêmement courte, de l'ordre de 10^{-10} seconde. Ils se désintègrent pour former des radicaux libres, non chargés, mais ayant toujours un électron non apparié. Dans le cas de l'eau, l'ion radicalaire réagit avec une autre molécule d'eau pour former le **radical hydroxyle**, lui aussi hautement réactif, noté $HO\cdot$:



Les radicaux libres réagissent généralement dans le micro-environnement direct de leur site de production selon différentes réactions (tableau 1.1). Ces réactions en cascades peuvent conduire à la production de multiples radicaux et donc d'un stress oxydant. Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autre composés non radicalaires très réactifs comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (tableau 1.2 page ci-contre).

Réactions redox	Oxydation Réduction Dismutation	$X\cdot \rightarrow X^+ + e^-$ $X\cdot + e^- \rightarrow X^-$ $X\cdot + X\cdot \rightarrow X^+ + X^-$
Recombinaison	$X\cdot + X\cdot \rightarrow X - X$	
Addition	$X\cdot + Y\cdot \rightarrow X - Y$	
Réactions avec des métaux	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO\cdot + Fe^{3+} + HO^-$ Réaction de Fenton $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow HO\cdot + O_2 + HO^-$ Réaction de Haber Weiss	

TABLE 1.1 – Les principales réactions radicalaires.

Oxygène	$^3\text{O}_2$
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Anion superoxyde	O_2^-
Radical hydroxyle	$\text{HO}\cdot$
Radical hydroperoxyde	$\text{HOO}\cdot$
Radical peroxyde	$\text{ROO}\cdot$
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	$\text{RO}\cdot$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Oxyde nitrique	$\text{NO}\cdot$
Peroxynitrique	ONOO^-
Hypochlorite	ClO^-
Pouvoir oxydant	$\text{HO}\cdot \geq \text{RO}\cdot \geq \text{HOO}\cdot \geq \text{ROO}\cdot \geq \text{NO}\cdot$

TABLE 1.2 – Les principales espèces réactives de l'oxygène.

1.4.3 Échelles de temps

Les échelles de temps impliquées dans les différents évènements décrits sont très vastes. Le processus physique, à partir de l'ionisation initiale, s'inscrit dans un ordre de temps de 10^{-15} seconde. Les premiers radicaux produits par l'éjection d'un électron ont généralement une durée de vie de l'ordre de 10^{-9} seconde dans la cellule tandis que les radicaux formés à l'ADN (soit par ionisation directe soit par $\text{HO}\cdot$) ont une durée de vie de l'ordre de 10^{-5} seconde. Mais finalement la période de temps entre la cassure de liaisons chimiques et l'expression d'effets biologiques peut être de l'ordre de la minute, de l'heure, de la journée, du mois, de l'année ou même d'ordre générationnel.

Synopsis

Chapitre 1

- Les radiations ionisantes regroupent les rayonnements électromagnétiques comme les rayons X et γ et les rayonnements particuliers comme les protons, les électrons, les particules α , les neutrons et les ions lourds chargés.
- Les radiations peuvent être soit directement soit indirectement ionisantes. Les radiations indirectement ionisantes interagissent avec la matière *via* l'effet Compton ou photoélectrique (pour les Rayons X et γ) ou par collision élastique ou inélastique (neutrons).
- L'interaction rayonnement - matière biologique se produit par action directe lorsque le rayonnement ionise directement une molécule biologique ou par action indirecte lorsque le rayonnement interagit avec une molécule d'eau, produisant ainsi des espèces radicalaires.
- Dans les cellules vivantes, la molécule critique est l'ADN.
- Le processus physique de l'absorption des rayonnements se produit en 10^{-15} s. Le processus chimique entraîne la formation de radicaux libres dont la durée de vie est de 10^{-5} seconde. Les processus biologiques prennent place dans des ordres de temps variant de quelques minutes à plusieurs générations.

2

Effets biologiques des rayonnements ionisants

Sommaire

2.1 Les effets moléculaires et cellulaires des rayonnements ionisants	23
2.1.1 La structure de l'ADN	23
2.1.2 Les lésions radio-induites	24
2.2 Réponses cellulaires : activation des voies de signalisation	27
2.2.1 Les voies de contrôle du cycle cellulaire	27
2.2.2 Réparations des lésions de l'ADN	29
2.2.3 Le contrôle de la réponse apoptotique	35
2.3 Les effets non ciblés	38
2.3.1 Le paradigme conventionnel centré sur le dommage à ADN	38
2.3.2 Définition des effets non ciblés et retardés	39
2.4 Effet de voisinage et réponse biologique	41
2.4.1 Effet de voisinage et dommages à l'ADN	41
2.4.2 La régulation du cycle cellulaire dans les cellules bystander	43
2.4.3 Les EROs dans réponse au voisinage	43
2.4.4 Le rôle du calcium	46
2.4.5 La communication cellulaire	47

L'OBJECTIF DE CE DEUXIÈME CHAPITRE est de présenter l'ensemble des conséquences biologiques des irradiations, comprenant la description des effets moléculaires et cellulaires (en terme de dommages) et la réponse cellulaire à l'irradiation. Le chapitre est abordé dans un premier temps d'un point de vue général afin de permettre d'appréhender les notions biologiques mises en jeu suite à l'irradiation. Dans un deuxième temps, ce chapitre introduit le paradigme conventionnel du dommage ciblé à l'ADN puis les effets non-ciblés et retardés observés à faibles doses d'irradiation, avant de s'attarder plus particulièrement sur l'effet de voisinage.

2.1 Les effets moléculaires et cellulaires des rayonnements ionisants

Les effets biologiques observables après irradiation au niveau d'un organisme, d'un tissu ou encore plus précisément au niveau de la cellule, sont la conséquence des perturbations moléculaires induites par les phénomènes d'ionisation et d'excitation précédemment décrits, se produisant sur le parcours des rayonnements ionisants. La réponse aux lésions causées par les effets directs et indirects des rayonnements repose sur des processus complexes et actifs, impliquant de nombreuses protéines. Selon la dose absorbée, et donc la sévérité des lésions, ces mécanismes auront *in fine* un rôle important pour la vie de la cellule.

2.1.1 La structure de l'ADN

La transmission des caractères héréditaires d'une génération à une autre repose sur la transmission d'une molécule, présente dans toutes les formes du règne vivant, l'acide désoxyribonucléique (ADN). Mise en évidence dès la fin du XIX^{me} siècle par Miescher, Altmann et Kossel, l'ADN a été modélisé en 1953, par Watson et Crick (figure 2.1 page suivante). Cette molécule contient, sous forme d'un code appelé code génétique, toutes les informations nécessaires à la vie et les caractéristiques de chaque individu.

L'ADN se présente sous la forme d'un polymère constitué par l'enchaînement de nucléotides. Le nucléotide est lui-même une entité constituée d'un phosphate relié à un sucre, le 2-désoxyribose lui-même relié par une liaison N-glycosidique à une base.

Des liaisons phosphodiester en 3' et 5' des 2-désoxyriboses relient ensuite les nucléotides entre eux. L'ADN comprend 4 bases principales, dont l'enchaînement définit le code génétique : l'adénine (A) et la guanine (G) qui constituent les bases puriques et la thymine (T) et la cytosine (C) qui constituent les bases pyrimidiques. La polymérisation des nucléotides permet la constitution d'un brin orienté 5'-3' caractérisé par la succession des nucléotides (A, T, G ou C).

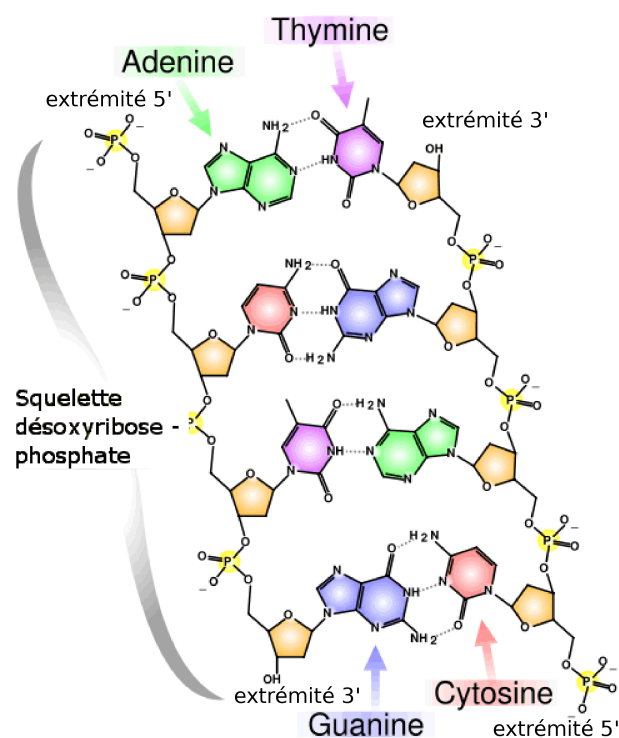


FIGURE 2.1 – La structure de l'ADN.

2.1.2 Les lésions radio-induites

Le bon fonctionnement d'une cellule et la transmission du patrimoine génétique dépendent de l'intégrité de la structure de l'ADN. Toute modification de sa structure ou de l'information qu'elle contient peut se révéler critique pour la survie cellulaire et, à plus ou moins long terme, pour l'organisme.

L'ADN est donc une cible cellulaire décisive des radiations ionisantes, les dommages ayant des conséquences létales (mort cellulaire suite au blocage de la réplication) ou pro-mutagènes (lésions non-réparées induisant des erreurs de réplication) pour la cellule (voir figure 2.2 page ci-contre).

Les radiations ionisantes induisent différents types de modifications, que ce soit de manière directe par ionisation ou indirecte par la génération d'espèces réactives de radicaux libres (Ward, 1997). Parmi ces diverses lésions, représentées dans la figure 2.3 page suivante, peuvent être détectées : des altérations et pertes de bases (sites abasiques), des modifications de sucres, des coupures de chaînes simple brin (CSB) ou double brin (CDB) et des pontages avec des protéines (Cadet et al., 2002, 2004). Le nombre et la distribution de ces dommages ne sont pas aléatoires mais dépendent du TEL du rayonnement, de la structure de l'ADN (simple, double, triple, quadruple brin, forme Z, courbure) et de certains paramètres tels que la température, la présence de composés protecteurs ou sensibilisateurs (pour revue, Rydberg, 2001).

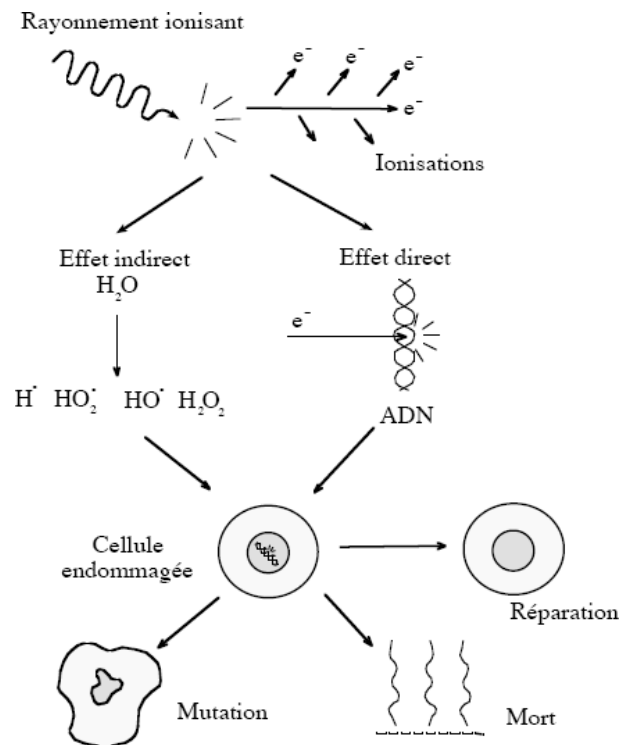


FIGURE 2.2 – Conséquences biologiques des rayonnements ionisants.

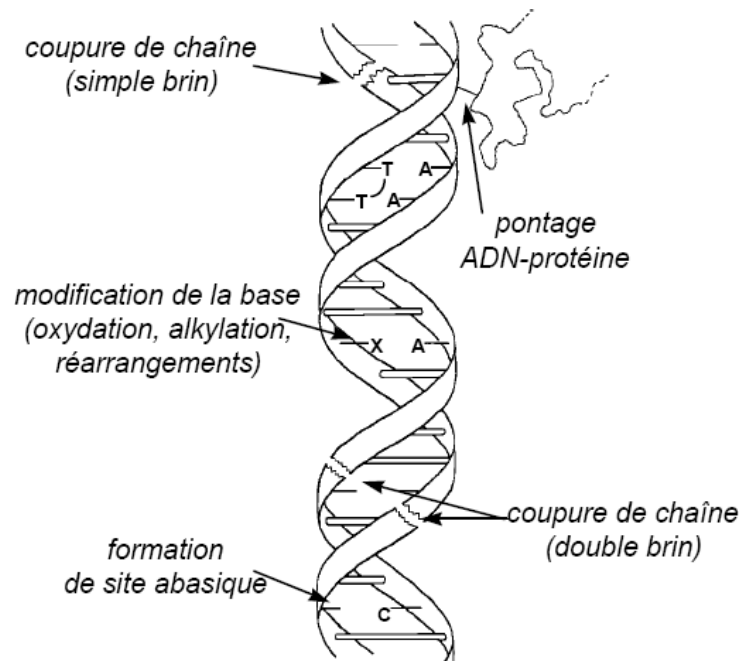


FIGURE 2.3 – Lésion radio-induites.

Dommages sur les bases nucléiques de l'ADN Les espèces réactives de l'oxygène sont capables de réagir avec la molécule d'ADN et entraîner la modification chimique des bases nucléiques. Plus d'une centaine de modifications par oxydation ont été décrites à l'heure actuelle (Beckman and Ames, 1997; Cadet et al., 1997; Burrows and Muller, 1998). Les plus importantes sont la 8-oxoguanine, qui est mutagène et peut entraver la transcription, et la thymine glycol, peu mutagène mais capable de bloquer la réplication et la transcription (Page et al., 2000; Wang et al., 1998).

Le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant ainsi un site abasique. Cette partie de l'ADN dépourvue alors d'une base purique ou pyrimidique, perd son information génétique pouvant conduire à l'apparition de mutation pendant la réplication (Loeb and Preston, 1986). Les sites abasiques peuvent spontanément se transformer en cassure simple brin.

Dommages sur les désoxyriboses et cassure de brins Les désoxyriboses sont les composants chimiques principaux du squelette de l'ADN (voir figure 2.1 page 24). Ces sucres possèdent de nombreux sites extrêmement sensibles aux espèces réactives de l'oxygène. Leur dégradation par oxydation conduit à la formation de cassures simple brin de la molécule d'ADN. Les radiations ionisantes sont capables d'induire directement ces cassures *via* l'ionisation. Dans ce cas, ces dernières peuvent être multiples et localisées. Lorsque ces ruptures de chaînes se produisent à quelques paires de bases de distance, elles entraînent la formation de cassures double brin (Sutherland et al., 2000), ce type de lésions étant particulièrement délétères pour la cellule. En effet, elles constituent un défi particulier pour la machinerie de réparation cellulaire en raison de l'absence de matrice pour la resynthèse. Elles peuvent être à l'origine de translocations et d'aberrations chromosomiques.

Les pontages Ces lésions concernent toute création de liaison covalente entre les constituants de l'ADN ou avec une molécule environnante. Ainsi, un pontage peut s'établir entre deux bases situées sur des brins opposés de la molécule d'ADN. Ce type de dommages est fortement cytotoxique car il bloque tout processus nécessitant la séparation des deux brins, comme la réplication ou la transcription. Ces lésions peuvent être catalysées par certains produits de la peroxydation radio-induites des lipides.

L'attaque radicalaire peut porter également sur les protéines entrant en contact avec l'ADN pour le protéger (telles les histones) ou pour le lire (telles les enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription). Des pontages entre l'ADN et ces protéines environnantes peuvent se former lorsque deux radicaux sont générés à la fois sur l'ADN et au niveau des acides aminés constitutifs des protéines.

Autrement, les dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN (Regulus et al., 2007).

Lésions radio-induites sur la membrane lipidique Les lipides et les acides gras insaturés, constituants du double feuillet phospholipidique, sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyl *via* une réaction appelée **peroxydation lipidique** (So-

mosy, 2000).

Les dommages oxydants sur les phospholipides vont perturber l'intégrité de la membrane et modifier la fluidité membranaire et par conséquent sa perméabilité (Somosy, 2000). Ceci entraîne des conséquences sur le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et donc sur la transduction des signaux. Toute altération de la membrane par les radicaux peut, en particulier, être responsable de la modification des flux calciques, lesquels sont impliqués dans les mécanismes apoptotiques (Chen and Chung, 1996). De plus, les peroxydes formés par cette réaction et les produits de dégradation de ces dérivés, comme le malonedialdéhyde (MDA) (Chaudhary et al., 1996) ou le 4-hydroxynonanal (4-HNE) (Chen and Chung, 1996), peuvent modifier à leur tour l'ADN cellulaire.

2.2 Réponses cellulaires : activation des voies de signalisation

Suite à l'irradiation différentes voies de signalisation sont activées, notamment la signalisation issue de la membrane cytoplasmique (activant une série de MAP kinases) ou encore une signalisation activée par les dommages à l'ADN et mettant en jeux les protéines ATM ou ATR (pour revue, Valerie et al., 2007). Ces signalisations conduisent à deux réponses cellulaires principales chez les cellules de mammifères. La première consiste en l'activation de la transcription de gènes, dont les produits sont impliqués dans les blocages temporaires du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN. La deuxième réponse survient consécutivement à l'échec de la première, il s'agit de la mort programmée : l'apoptose radio-induite.

2.2.1 Les voies de contrôle du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire peut se schématiser par une séquence de quatre étapes (figure 2.4 page suivante). La cellule peut être quiescente (phase G0), elle peut être engagée dans un cycle cellulaire (phase G1), dupliquer son ADN en phase S, se situer en phase G2 (avant mitose) ou enfin entrer en mitose (répartition du matériel génétique entre les deux cellules filles).

En général, les cellules ne progressent pas dans la phase suivante du cycle cellulaire avant d'avoir achevé tous les événements associés à la phase précédente. Pour cela, des mécanismes de surveillance permettent à la cellule de s'assurer de l'exécution complète des événements d'une phase avant d'initier les événements associés à la phase suivante et assurent ainsi une duplication et une transmission fidèle du génome aux cellules filles résultant de la division cellulaire.

La machinerie moléculaire du cycle cellulaire est composée de facteurs de régulation qui contrôlent la progression dans le cycle cellulaire. Différents points de contrôles, le point de restriction R en G1, le passage de G1 en S, le passage de G2 en M, sont sous le contrôle d'une famille de protéines kinases à sérine/thréonine de petite taille de 35 à 40 kDa, les kinases dépendantes des cyclines (CDK).

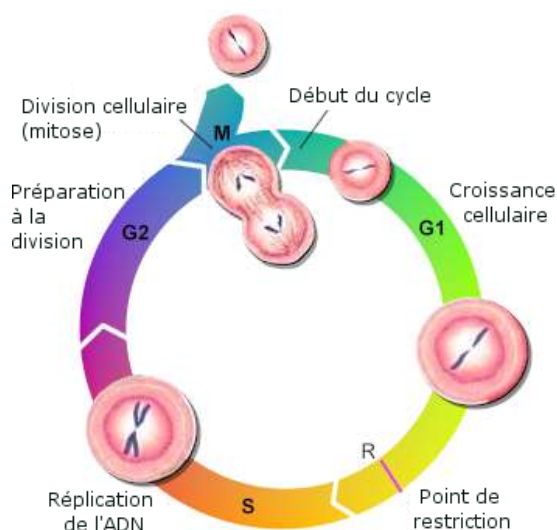


FIGURE 2.4 –
Cycle cellulaire d'une cellule eucaryote.

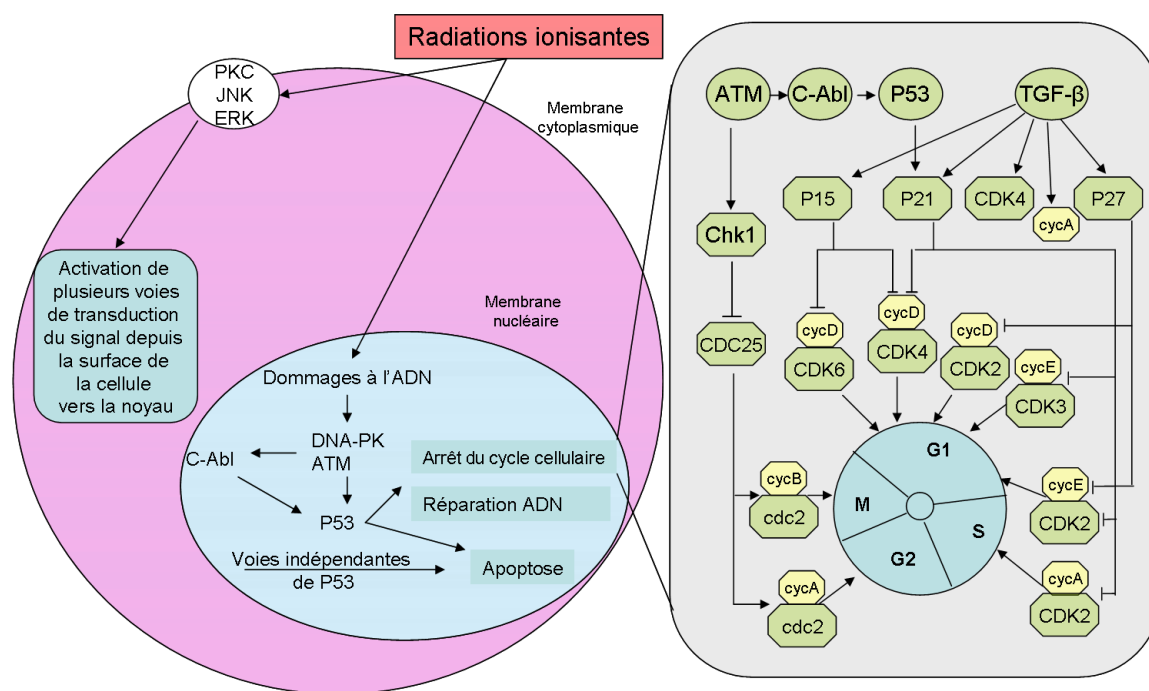


FIGURE 2.5 – Représentation simplifiée des mécanismes de surveillance du cycle cellulaire (G1 et G2 checkpoints) après irradiation d'après Teyssier F (1999). Les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire mettent en jeu des cascades de protéines kinases induites par les lésions de l'ADN et les dommages membranaires radio-induits. Les principaux arrêts ont lieu en phase G2 et G1.

Ces CDK régulent l'activité de nombreuses protéines par phosphorylation (Iliakis, 1997), (figure 2.5 page ci-contre).

L'initiation du contrôle du cycle cellulaire implique des protéines senseurs de dommages, telles que les protéines ATM (ataxia telangectasia mutated) et DNA-PK (DNA-dependent protein kinase). Ces deux protéines kinases activées par les dommages de l'ADN (Meyn, 1995) ont fonction, par analogie, de signal d'alarme.

Ces protéines peuvent induire un arrêt de la progression cellulaire en activant la protéine suppresseur de tumeur P53, gardienne du génome. La protéine P53 activée agit comme facteur de transcription et régule l'expression de nombreux composants impliqués dans les voies de régulation du cycle cellulaire (Zhan et al., 1993). Le plus connu, la protéine P21^{waf}, est un inhibiteur des CDK, une famille de protéines kinases connues comme régulateurs clés de la progression du cycle cellulaire. P21^{waf} est capable d'inhiber de nombreuses CDK, mais est plus efficace envers les cyclines de G1/S (Medema et al., 1998). D'autres inhibiteurs de CDK, p27^{KIP1} et p15^{INK4b}, sont induits par les radiations ionisantes et contribuent à l'arrêt en G1. Il a également été montré que l'arrêt en G2 radio-induit nécessitait une phosphorylation inhibitrice de la kinase CDC2, via une voie de signalisation ATM-dépendante.

Les régulateurs du cycle cellulaire sont des cibles privilégiées des processus oncologiques et peuvent être responsables d'une réponse défailante des cellules tumorales aux radiations ionisantes. La fonction principale de l'arrêt en G1 médié par P53 permet l'élimination des cellules ayant des lésions de l'ADN alors que l'arrêt en G2 jouerait au contraire un rôle essentiel dans la survie des cellules irradiées (Iliakis, 1997).

2.2.2 Réparations des lésions de l'ADN

Les cellules de mammifères peuvent subir jusqu'à 100000 lésions à l'ADN par jour résultant de facteurs endogènes comme le métabolisme oxydatif (mitochondries) ou d'erreurs de réplifications, mais aussi résultants de différents agents extérieurs tels que l'exposition aux rayonnements cosmiques naturels, aux ultra-violets du soleil ou l'exposition aux génotoxiques chimiques. Comme certaines lésions sont mutagènes, il faut les réparer. Selon le type de lésions, les cellules de mammifères ont développées différents moyens de réparation de ces lésions (pour revue, Hoeijmakers, 2001).

Comme précisé précédemment, les radiations ionisantes, par effet direct ou par effet indirect avec la génération d'espèces réactives de l'oxygène, peuvent induire des dommages au niveau des bases, des cassures double ou simple brin, des dommages des sucres et des pontages ADN-ADN ou ADN-protéines. Les différents systèmes de réparation définis ci-dessous peuvent donc intervenir dans la réparation de ces lésions.

La réparation des mésappariements : le mismatch repair (MMR). Le système de réparation MMR supprime les nucléotides mésappariés créés lorsque l'ADN polymérase

glisse sur des séquences répétitives de nucléotides au moment de l'insertion ou la délétion de boucles que ce soit :

- au cours de la **réplication** permettant ainsi une réplication efficace sans erreur de polymérase,
- ou encore au cours d'autre type de réparation, pendant la **recombinaison homologue** par exemple (système de réparation explicité ci-dessous).

Ce système MMR est donc utile tous les jours. Un défaut du MMR entraîne l'augmentation des mutations, ce qui peut alimenter les processus d'oncogénèse. Les motifs d'ordre spécifiques composés de répétitions de dinucléotides sont instables dans de nombreux cancers humains. Le phénotype d'instabilité des microsatellites par exemple est provoqué par le défauts du système MMR dans le cancer héréditaire colorectal et dans une variété de cancers sporadiques.

Réparation par excision des bases (BER, Base Excision Repair). Les dommages de bases de l'ADN sont réparés par le système de réparation par excision de base illustré par la figure 2.6 page 32. Ce système est utilisé pour réparer les bases modifiées (principalement du aux espèces réactives de l'oxygène), les sites abasiques et les cassures simple brin. C'est un mécanisme de réparation fidèle de l'ADN car il utilise le brin complémentaire comme matrice.

Réparation par excision de Nucléotide (NER, Nucleotide Excision Repair). Au quotidien, ce mécanisme est impliqué dans la réparation des lésions de l'ADN produites principalement par les ultraviolets et mineurement par les rayonnements ionisants que sont les adduits, les pontages intra-chaînes ou protéines-ADN (figure 2.7 page 33). Ce système intervient sur les lésions encombrantes avec distortion de l'ADN.

Ces deux précédents systèmes de réparations font intervenir différentes protéines qui pour certaines d'entre elles, telles que PCNA, sont impliquées à la fois dans la réparation par excision de base et par excision de nucléotides, ainsi que dans la réplication de l'ADN.

Réparation des cassures double brin de l'ADN : recombinaison homologue (HR) ou recombinaison non homologue par jonction des extrémités (NHEJ).

Les CDBs résultent de l'action des rayonnements ionisants, des radicaux libres, des produits chimiques ou encore se produisent après le blocage de la réplication, au cours de la mitose ou de la méiose, ayant pour cause la détection d'une CSB (figure 2.8 page 34). Après la détection de CDBs, une cascade complexe de réactions est déclenchée visant l'arrêt du cycle cellulaire et le recrutement des facteurs de réparation (Zhou and Elledge, 2000; Khanna and Jackson, 2001). Un des premiers initiateurs est la protéine kinase Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), qui si est défectueuse prédispose à l'apparition de cancers (Rotman and Shiloh, 1998). L'arrêt en G1 est médié par l'intermédiaire de P53. Un autre événement précoce, qui dépend des protéines kinases ATM, ATR et de DNA-PK, est la phosphorylation de histone H2AX sur un large domaine de l'ADN entourant l'emplacement de la lésion CDB (Paull et al., 2000). Ceci permet de maintenir localement la

chromatine dans un état stable et spécifique pour permettre la mise en place des systèmes de réparation complexes ainsi que le recrutement des protéines de réparation. La recombinaison homologue (Homologous Recombination, HR) et la recombinaison non homologue par jonction des extrémités (Non Homologous End Joining) sont les principaux modes de réparation. Lorsque, après la réplication (en phase G2), une copie de l'ADN est disponible, alors la recombinaison homologue est préférentiellement mise en place. Autrement, pour le reste du cycle cellulaire (et principalement en G1), les cellules se dirigeront vers le système NHEJ, système de réparation infidèle, prédisposant beaucoup plus à l'apparition d'erreurs. Les mécanismes présumés sont exposés en figure 2.8 page 34.

La réparation des pontages. Les pontages ADN-ADN ou ADN-protéines induits par les radiations sont insuffisamment étudiés pour pouvoir en estimer le nombre. Les gènes et les signalisations impliqués dans leur réparation sont encore en cours d'investigation. De récentes études semblent néanmoins impliquer plusieurs systèmes de réparation tels que les systèmes NER et HR (Barker et al., 2005).

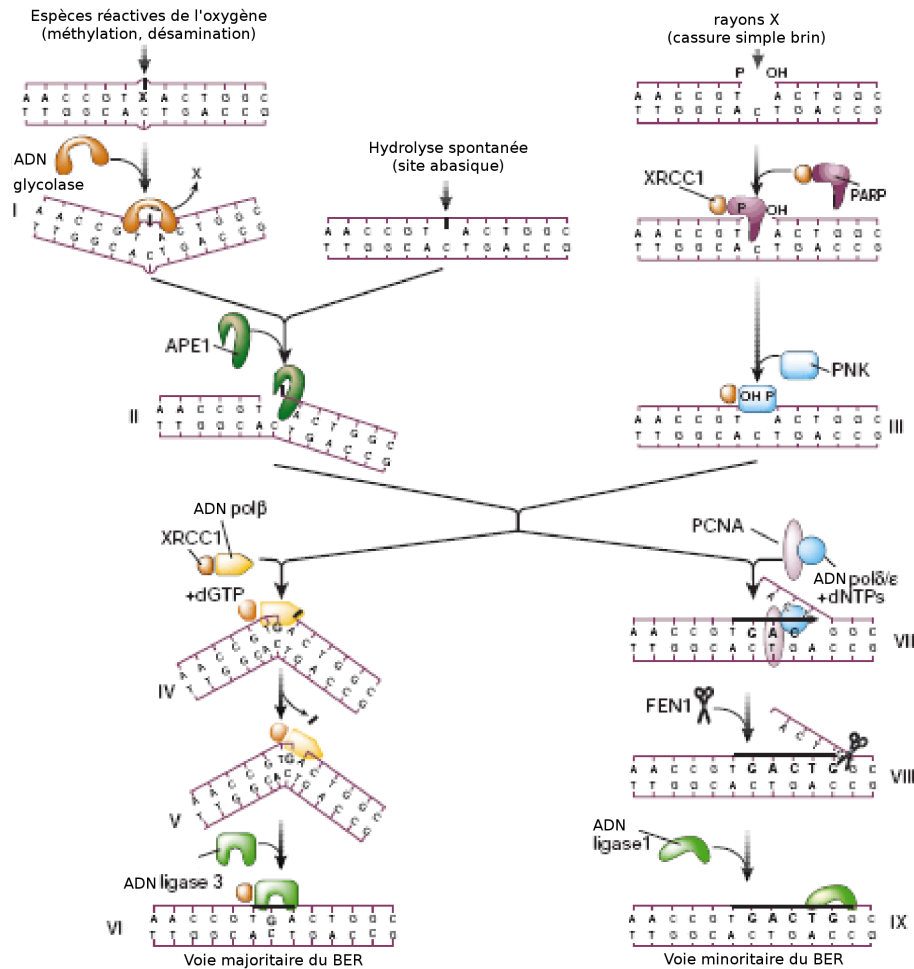


FIGURE 2.6 – Base Excision Repair, d'après Hoeijmakers, 2001. Une glycosylase, (une glycosylase donnée s'occupant d'un type de lésion plus ou moins spécifique), vient chevaucher partiellement le spectre des lésions. Ceci constitue la première réaction. Les glycosylases entraînent le basculement de la base lésée en dehors de la double hélice d'ADN pour la loger dans une cavité intérieure de la protéine. A l'intérieur de la protéine, la base lésée est alors clivée (étape 1 de la figure), formant un site abasique. Ce site abasique peut aussi se former spontanément par hydrolyse. L'action centrale du système BER est initiée par l'incision du brin au niveau du site abasique par l'endonuclease APE1 (étape 2). La Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) ainsi que la polynucleotide kinase (PNK) (Whitehouse et al., 2001), qui s'attachent au brin cassé, jouent un rôle important dans le système BER lorsque celui-ci est initié par une cassure simple brin de l'ADN (Single Stranded Break = SSB) ; elles protègent et préparent les extrémités des brins à la resynthèse (étape 3). Deux voies sont ensuite possibles pour la réparation. La voie dominante chez les mammifères fait intervenir l'ADN pol β . L'ADN pol β reconnaît et comble le site abasique (étape 4) et enlève le résidu de sucre sans base à l'extrémité 5' *via* son activité lyase (étape 5). La liaison des brins est ensuite assurée par le complexe XRCC1-ligase3 (étape 6). La seconde voie, mineure, implique l'ADN pol β , l'ADN pol δ/ϵ , et PCNA pour la resynthèse d'un fragment de brin de 2 à 10 bases, ainsi que l'endonuclease FEN1, qui supprime le fragment d'ADN remplacé, et l'ADN ligase 1, pour relier les 2 brins (étapes 7 à 9).

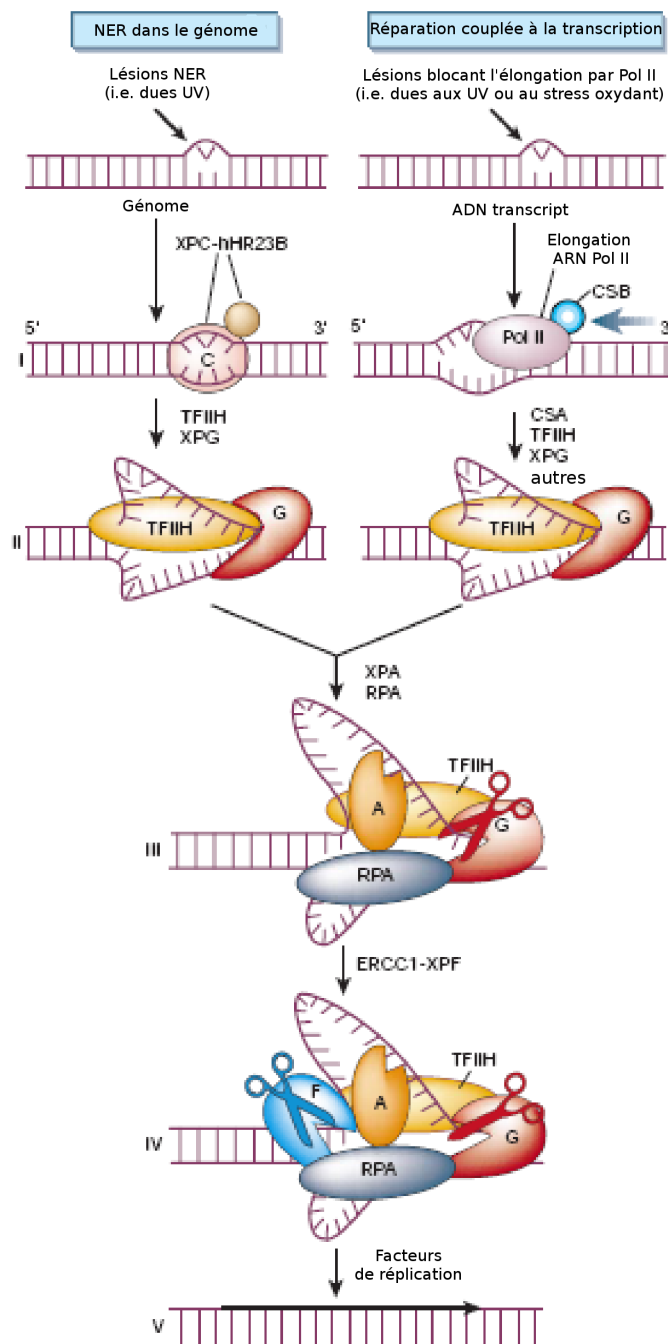


FIGURE 2.7 – Nucleotide Excision Repair.

nucléotide composé de 24 à 32 bases et contenant la lésion (étape 4). La machinerie de réplication de l'ADN accomplit alors la réparation en remplissant la brèche (étape 5). En somme, plus de 25 protéines participent au système NER. De nombreuses études *in vivo* indiquent que les différents acteurs du système NER sont rassemblées d'une manière graduelle et en composantes individuelles au site d'une lésion. Après un événement de réparation simple (qui peut prendre plusieurs minutes) le complexe entier est désassemblé de nouveau (Houtsmuller et al., 1999).

La figure ci-contre décrit le système de réparation par excision de nucléotide d'après Hoeijmakers (2001). La reconnaissance des lésions par le complexe spécifique XPC-hHR23B s'effectue à partir d'une reconnaissance de la désorganisation dans l'appariement des bases, provoqués par les lésions (Sugasawa et al., 2001). Lorsque la réparation est couplée à la transcription (Transcription coupled repair, TCR), la capacité de la lésion à bloquer l'ARN polymérase est une étape critique. La polymérase doit être déplacée pour rendre la lésion accessible à la réparation et cela exige au moins deux facteurs TCR-spécifiques : CSB et CSA. Les stades ultérieurs du NER et du TCR sont ensuite identiques. Les hélicases XPB et XPD, du facteur de transcription multi-sous-unité TFIIH, ouvrent environ 30 paires de bases de l'ADN autour du dommage (étape 2) (van Hoffen et al., 2003). XPA confirme probablement la présence de dommages en sondant la structure du squelette phosphodiester-sucré de l'ADN et entraîne en cas d'absence de dommages l'abandon du NER. La protéine RPA (Replication Protein A) stabilise l'intermédiaire ouvert en se liant au fil non endommagé (étape 3). Le duo d'endonucléases du système NER, XPG et ERCC1/XPF, coupe respectivement les extrémités 3' et 5' de l'étendue ouverte au niveau du brin endommagé, en produisant un oligo-

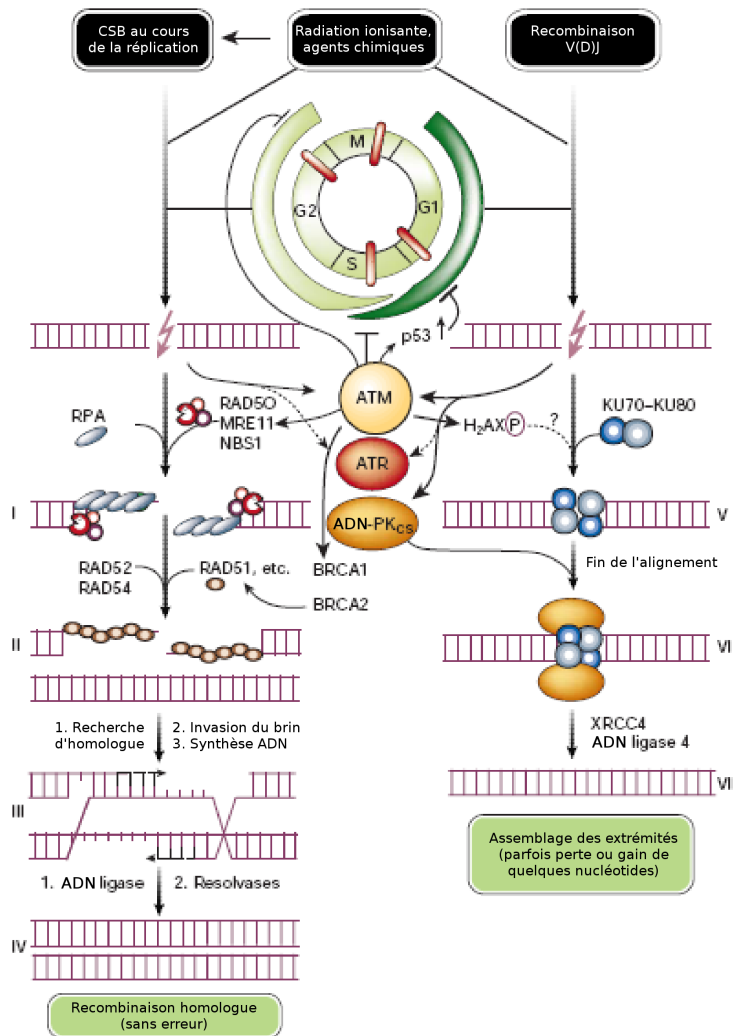


FIGURE 2.8 – Réparation des CDBs : NHEJ ou HR.

Le système de recombinaison homologue (d'après Hoeijmakers (2001)) est décrit dans le panneau gauche de la figure. Pour favoriser la re-liaison des séquences homologues, l'activité 5'-3' exonucléase du complexe RAD50/MRE11/NBS1 (qui sont aussi substrats de ATM) expose les deux extrémités 3' (étape 1) (Petrini, 2000). RPA facilite l'assemblage du filament nucléoprotéique composé de RAD51 et potentiellement de XRCC2, XRCC3, RAD51B, C et D (étape 2). RAD51 possède la capacité d'échanger un brin simple avec une séquence équivalente d'une structure double brin. Le positionnement correct des chromatides sœurs par des cohésines facilite l'identification de la séquence homologue. Un candidat au complexe chromatinien pour les transactions associées à cette gymnastique de l'ADN est RAD54, un membre de la famille SWI/SNF (ATPases ADN-dépendantes). Suite à l'identification de la chromatide sœur, la copie intacte provenant de l'ADN double brin est utilisé comme modèle pour corriger correctement les extrémités cassées par la synthèse de l'ADN (étape 3). Finalement, ce brin nommé fragment de Holliday est intégré par des résolvases (étape 4). La recombinaison homologue implique l'action simultanée d'un grand nombre de molécules, lesquelles sont concentrées dans des foyers nucléaires radio-induits. Ceux-ci incluent BRCA1 et BRCA2. De récentes études impliquent BRCA2 directement ou indirectement dans la translocation nucléaire de RAD51. Les cellules en G1 ont uniquement le chromosome homologue pour la réparation par recombinaison, cependant les chromosomes sont dispersés dans le noyau, il est donc difficile de les réunir pour corriger les erreurs. De plus, copier le chromosome homologue est potentiellement dangereux car il peut mener à une homozygotie des mutations récessives. Comme alternative, la réaction de réparation par jointure des extrémités d'une cassure double brin, sans modèle, peut être réalisée en utilisant les complexes de liaison KU70/80 et DNA-PK α , suivit de la ligation par XRCC4-ligase4 (étape 5 à 7). La fonction de KU70/80 implique la protection des extrémités et le rapprochement des brins. Ce type de réparation est parfois associé à une perte ou un gain de quelques nucléotides si des microhomologies internes sont utilisées pour aligner les séquences avant la liaison, impliquant la participation des ADN polymérases et/ou nucléases.

2.2.3 Le contrôle de la réponse apoptotique

L'irradiation est une des agressions d'origine physique capable d'induire des effets létaux dont l'apoptose. Par ailleurs, l'apoptose est un mode de réponse aux radiations, parmi d'autres, dont l'importance dépend étroitement du type cellulaire irradié.

L'apoptose

Le terme d'apoptose a été introduit en biologie en 1972 par Kerr *et al.* (Kerr et al., 1972) pour désigner une forme particulière de mort cellulaire. Il est issu du mot grec *apoptosis* (*apo* : loin de, qui marque un achèvement ; *ptosis* : chute) employé pour définir la chute des feuilles ou des pétales. En effet, au sein d'un tissu, la cellule qui meurt par apoptose, se détache de ses voisines comme la feuille qui tombe de l'arbre.

Cette mort cellulaire est un processus actif (Ellis and Horvitz, 1986; Cummings et al., 1997) mettant en jeu un programme préétabli d'interactions moléculaires, et silencieux sans phénomènes inflammatoires d'accompagnement (voir figure 2.3 page 119). Ces aspects différencient l'apoptose de la nécrose qui est une mort passive et bruyante avec réaction inflammatoire secondaire.

Phénomène physiologique fondamental de la vie des organismes pluricellulaires, l'apoptose constitue également un mode suicidaire de réponse cellulaire à une agression externe chimique ou physique incluant les radiations (Hengartner, 2000). Dans un premier temps, il est utile de faire un rappel synthétique des connaissances actuelles sur l'apoptose en général, avant de se focaliser sur l'apoptose radio-induite en se limitant au cas des radiations ionisantes.

La signalisation de l'apoptose

La première étape de l'apoptose, **réversible**, se caractérise par une chute du **potentiel trans-membranaire des mitochondries** liée à une ouverture de mégapores par lesquels sont déversés dans le cytosol différentes molécules telles que le cytochrome c, le facteur AIF (apoptosis inducing factor) et des espèces réactives de l'oxygène (Susin et al., 1997). Cette étape est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 qui pourraient être des constituants ou des régulateurs des mégapores mitochondriaux. Leur action est anti-apoptotique en inhibant le passage vers le cytosol du cytochrome c et du facteur AIF. En fait, les gènes bcl-2 appartiennent à une famille de gènes comprenant une quinzaine de membres dont certains, comme bax, codent pour des protéines toujours localisées sur la membrane mitochondriale mais dont la fonction est cette fois pro-apoptotique. Schématiquement, c'est la résultante des interactions opposées entre gènes anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la grande famille bax/bcl-2 qui fixe le niveau d'activité des protéines anti-apoptotique type Bcl-2 conditionnant l'apoptose (Reed, 1994).

La deuxième étape correspond à l'activation en cascade par le cytochrome c et le facteur AIF d'une famille de protéases à cystéine ou **caspases** qui clivent leur substrat au niveau d'un résidu aspartate. Ces protéases dégradent spécifiquement des protéines

Si les dégâts sont irréparables, là encore, il peut y avoir activation du programme apoptotique.

3. par l'intermédiaire de la membrane où les récepteurs de mort sont activés soit par l'énergie déposée au niveau de la membrane par l'irradiation elle-même soit par P53.
4. par l'intermédiaire de la membrane conduisant à l'activation d'un processus dépendant du céramide. En effet, l'irradiation peut activer en quelques minutes la dégradation enzymatique de la sphingomyéline membranaire en céramide et phosphocholine (Haimovitz-Friedman et al., 1994). Le céramide, ainsi généré, active la première protéine kinase d'une voie de transduction du signal vers le noyau, aboutissant après une cascade de phosphorylations à celle de la protéine nucléaire c-Jun. La phosphorylation du facteur de transcription c-Jun induit l'expression de gènes pro-apoptotiques dont le gène TNF α ou BAX (Verrelle, 1998).

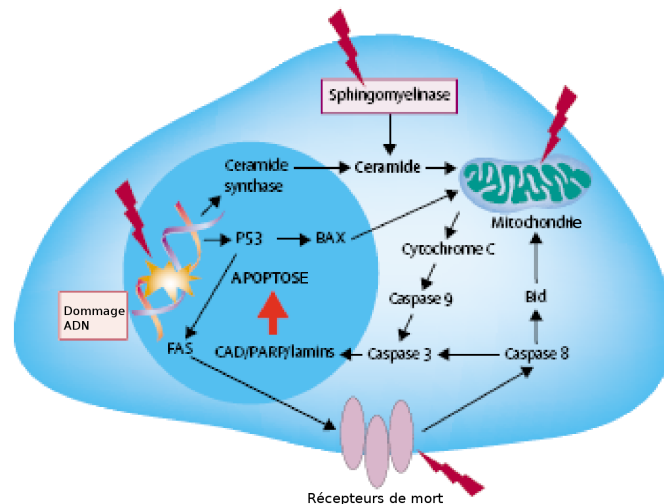


FIGURE 2.10 – Apoptose radio-induite.

D'après Prise et al. (2005). (CAD; caspase activated DNase)

L'implication des espèce réactives de l'oxygène dans l'apoptose radio-induite se fait à plusieurs niveaux :

- résultant de l'effet physicochimique des radiations ionisantes sur l'oxygène, ils constituent un stress oxydatif activant la voie SAPK/JNK, peut être par l'intermédiaire de ATM et c-Abl,
- ils peuvent léser l'ADN et donc induire la voie P53 dépendante de l'apoptose,
- ils sont produits et excrétés par la mitochondrie lors de l'exécution de l'apoptose et amplifient le processus en provoquant des lésions de la membrane mitochondriale, cette action sur les mitochondries est contrée par les protéines de stress HSP70 et HSP27 (heat shock proteins) qui constituent un mécanisme supplémentaire de régulation négative de l'apoptose,
- et enfin, ils sont générés par des oxydo-réductases P53 dépendantes.

2.3 Les effets non ciblés

2.3.1 Le paradigme conventionnel centré sur le dommage à ADN

Depuis la naissance de la radiobiologie dans les années 1940 avec la publication de deux livres (Lea, 1962 et Timofeeff-Ressovsky, 1947), la notion de cible critique des radiations était apparente ; les radiations déposent leur énergie en traversant la matière et l'induction d'effets biologiques devait bien provenir de l'endommagement d'une cible particulière. Il avait été montré que les chromosomes étaient endommagés par les radiations et ceci aboutissait à des problèmes de division cellulaire, voire l'apparition de cancer. C'est donc logiquement que l'ADN est devenu le candidat idéal à cette fonction de cible.

L'ADN est la cible des radiations, et aussi, par extension, le noyau qui le contient. Plusieurs revues appuient ce fait (Gray, 1954; Alper, 1960; Savage, 2002; Bassal and El-Osta, 2005). Les conséquences biologiques des dommages infligés à l'ADN par les radiations, qu'ils soient non réparés ou mal réparés, étaient alors principalement mises en évidence à travers la capacité de la cellule à se reproduire ou à se diviser (Elkind et al., 1967). Suite à certains travaux quantifiant cette capacité, il était considéré qu'une cellule survivante à plus de quatre réplifications suite à l'irradiation, ne devait pas contenir de lésions létales (Elkind and Whitmore, 1967; Puck, 1956). Cette hypothèse resta incontestée jusqu'à l'utilisation des protocoles de survie clonogénique dans les années 1980. Ces essais ont clairement mis en évidence la persistance de mutations et l'inductions de transformations cellulaires dans les cellules survivant aux radiations.

Les protocoles de survie clonogénique permettent l'établissement de courbes de survie en relation avec la dose reçue. Ce modèle d'étude devient dominant en radiobiologie et participe grandement à la réalisation d'avancées majeures concernant la compréhension des mécanismes d'apparition des dommages à l'ADN et de leur réparation pour tout type de rayonnements (pour revues, Cleaver et al., 2003; Costa et al., 2003; Sinha and Heder, 2002; Stojic et al., 2004). Ces études centrées sur les dommages à l'ADN aboutissent à une concentration des recherches, dans les années 1970 et 1980, sur un type de dommage caractéristique suite à exposition aux radiations ionisantes ; les cassures double brin (CDBs). En effet, l'apparition des CDBs est quantifiable en fonction de la dose et donc peut être interprétée et formalisée mathématiquement toujours selon la théorie de la cible ADN (Chadwick and Leenhouts, 1973; Kellerer, 1972). Ces corrélations sont toujours d'actualité aujourd'hui pour justifier l'utilisation du **modèle linéaire sans seuil** en radioprotection (Barendsen, 1994a,b; Martin, 2005; Preston, 2003).

Bien d'autres travaux depuis ont consolidés ceux-ci ; les CDBs sont des lésions critiques car elles peuvent mener à une non réparation ou une mauvaise réparation conduisant à des conséquences biologiques observables et dépendantes de la dose (pour revue, Prise, 1994).

Cependant la faiblesse du modèle linéaire sans seuil établi sur le dommage à l'ADN (Alper et al., 1960; Powers, 1962) est de ne pas considérer l'ensemble des dommages créés suite à l'irradiation, ainsi que les conséquences en terme de mort cellulaire, mutations ou transformations cellulaires.

La littérature reflète ce problème très tôt (Sinclair, 1964) mais le phénomène s'accroît considérablement à la fin des années 1980 et début 1990. Il apparaît que les dommages à l'ADN ne peuvent justifier toutes les réponses cellulaires observées, en particulier dans le cas d'irradiation à faible dose.

Dans la descendance lointaine de cellules irradiées, les phénomènes observés sont variés et prennent différentes appellations ; mutations létales, mort retardée ou instabilité chromosomique toutes relevant globalement d'une instabilité génomique (pour revue, Mothersill and Seymour, 1997a; Wright, 1999).

Mais le paradigme conventionnel du dommage à l'ADN est d'autant plus mis en défaut avec l'observation de phénomènes plus particuliers. De multiples études démontrent des phénomènes de radioadaptation ou encore l'apparition de dommages dans des cellules voisines de cellules irradiées (Morgan, 2003a,b; Mothersill and Seymour, 2006a; Tapio and Jacob, 2007). Ces différents phénomènes sont tous issus de conséquences biologiques observées dans des cellules n'ayant pas été exposées directement aux radiations ; aujourd'hui ils sont regroupés sous la dénomination d'**effets non ciblés ou retardés** (Mothersill and Seymour, 2006c; Morgan, 2003a; Little, 2003).

2.3.2 Définition des effets non ciblés et retardés

Parmi les effets non ciblés ou retardés, trois grands phénomènes peuvent être décrits : l'instabilité génomique, la radioadaptation et l'effet de voisinage (Morgan and Sowa, 2005, 2007). Ces phénomènes induits dans des cellules non directement touchées par l'irradiation mettent en cause la notion de cible, d'où leur noms. Ils sont brièvement présentés ci-dessous.

L'instabilité génomique

L'instabilité génomique correspond à une dénomination décrivant globalement l'augmentation du taux de modifications dans le génome. L'instabilité induite par l'irradiation est observée dans les cellules à des temps éloignés après irradiation et se manifestent plus précisément dans la descendance de ces cellules, après de multiples divisions (figure 2.11 page suivante).

Cette instabilité décrite dans de multiples revues (Wright, 1998; Little, 2000) se mesure *via* l'altération de chromosomes, les changements de ploïdie, l'instabilité des microsatellites ou encore la diminution de l'efficacité d'étalement des cellules (*plating efficiency*) (Kadhim et al., 1992; Sabatier et al., 1994). De multiples voies de signalisation sont impliquées dans ce phénomène, que ce soit pour l'initier ou pour le perpétuer (Kaplan et al., 1997; Limoli et al., 2001). La contribution relative de ces différentes voies dépend à la fois de la patrimoine génétique de la cellule ciblée et du type d'organisme (Watson et al., 1997; Morgan and Sowa, 2005).

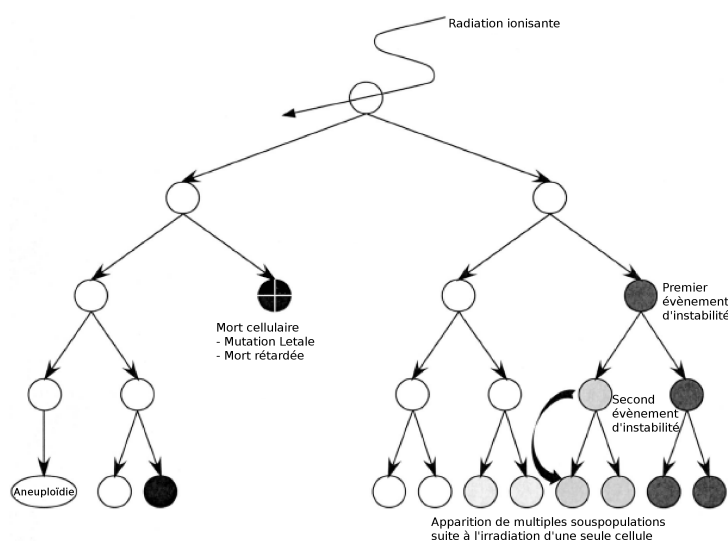


FIGURE 2.11 – Représentation schématique de l'instabilité génétique. Une cellule survivant à l'irradiation se reproduit de façon clonogénique. Durant cette expansion clonale, une partie de la descendance meurt (mutations létales ou mort retardée) ce qui entraîne une diminution de l'efficacité d'étalement de ce clone. Alternativement, des événements d'instabilité peuvent apparaître dans la progéniture de la cellule irradiée. Ceux-ci peuvent résulter de réarrangements chromosomiques, d'aberrations, de micronoyaux, d'amplifications de gène, d'échec de la ségrégation des chromosomes durant la mitose. D'après Morgan (2003a).

La réponse adaptative

La réponse adaptative est induite dans les cellules eucaryotes suite à une première exposition à de faibles doses ou à un faible débit de dose d'irradiation. Cette réponse est caractérisée par une diminution des effets génétiques délétères, tels que des dommages chromosomiques ou les mutations de gènes, suite à une nouvelle irradiation à de plus fortes doses (Tapio and Jacob, 2007). De nombreuses études ont contribué à caractériser cette réponse, la plupart étant réalisées sur des lymphocytes humains (pour revue, Rigaud and Moustacchi, 1996).

L'effet de voisinage

Le concept d'effet de voisinage (ou en anglais *bystander effect*) est initialement utilisé dans le domaine de l'immunologie depuis les années 1970 pour décrire l'apparition d'une réponse immunitaire dans une population non directement stimulée mais mélangée à une population cellulaire qui l'avait été.

Ce terme d'effet de voisinage, que l'on nommera aussi effet *bystander*, a donc été repris en radiobiologie suite à la mise en évidence en 1992 par Nagasawa and Little (1992) d'un phénomène au voisinage suite à exposition de cellules à des particules alpha. Le terme d'effet de voisinage a donc été redéfini en 2000 par Djordjevic (2000) pour décrire une réponse

cellulaire provenant de cellules directement irradiées induisant l'apparition de dommages dans les cellules voisines non irradiées.

Depuis le début des années 1990, les avancées technologiques ont grandement participé à l'élaboration de protocoles d'irradiations permettant de définir la cible de l'irradiation et ainsi de discriminer cellules ciblées et cellules voisines. L'utilisation des microfaisceaux en radiobiologie permet dans ce cadre de déterminer le mécanisme de l'effet de voisinage. Mais au delà de la discrimination entre cellules cibles et voisines, ces installations permettent aussi un choix de cible au niveau subcellulaire telles que des irradiations localisées au noyau ou au niveau cytoplasmique. De telles études ont participé à démontrer que l'ADN n'est pas la cible exclusive de l'irradiation (Shao et al., 2004; Tartier et al., 2007).

L'effet de voisinage est aujourd'hui le type d'effet non ciblé le plus étudié (pour revue, Morgan and Sowa, 2007). Cette réponse de voisinage induite par les radiations englobe un nombre varié d'effets, majoritairement au détriment de la cellule. Ces différents effets sont observables dans différents types cellulaires et dépendent à la fois du type cellulaire produisant ce signal *bystander* mais aussi du type cellulaire recevant ce signal. Par conséquent, aucune règle rigide ne peut être appliquée à la multitude de réponses se produisant dans les cellules non directement ciblées par l'irradiation. La complexité de ce phénomène fait l'objet de la section suivante.

2.4 Effet de voisinage et réponse biologique

Dans les paragraphes ci-dessous l'effet de voisinage est aussi nommé effet *bystander*. Les cellules non irradiées mais voisines de cellules irradiées sont parfois nommées par le même raccourci de langage, cellules *bystander*. Par extension, les signaux conduisant à un effet de voisinage sont de la même façon nommés signaux *bystander*.

2.4.1 Effet de voisinage et dommages à l'ADN

L'existence de l'effet de voisinage est toujours mis en évidence par l'observation de dommages à l'ADN, relatifs à la génotoxicité, dans les cellules non ciblées. Ces dommages concernent différents phénomènes tels que :

- l'induction de mutations dans l'ADN nucléaire (Huo et al., 2001; Zhou et al., 2000, 2001) et dans l'ADN mitochondrial (Murphy et al., 2005),
- les aberrations chromosomiques (Zhou et al., 2001; Little et al., 2003; Nagasawa and Little, 2002; Suzuki et al., 2004),
- la formation de micronoyaux (Azzam et al., 2003b, 2001; Shao et al., 2004, 2003d; Konopacka and Rzeszowska-Wolny, 2006; Ponnaiya et al., 2004).
- la mort cellulaire (Sedelnikova et al., 2007; Hamada et al., 2008).

Les mutations dans les cellules *bystander* correspondent en majeure partie à des mutations ponctuelles, alors que celles observées dans les cellules ciblées correspondent à des délétions (totales ou partielles) (Huo et al., 2001; Nagasawa et al., 2003). La majorité

des aberrations chromosomiques sont induites par des mutations de bases ou des cassures simple brin de l'ADN (Little et al., 2003; Nagasawa and Little, 2002; Nagasawa et al., 2005). Une partie des aberrations chromosomiques ainsi que les micronoyaux proviennent quant à eux de la non réparation ou de la mauvaise réparation de cassures double brin (Shao et al., 2003d; Konopacka and Rzeszowska-Wolny, 2006; Ponnaiya et al., 2004).

Comme précisé au début de ce chapitre 2, (voir section 2.2.2 page 29), la réparation des CDBs implique soit le système NHEJ soit le système HR. Ces systèmes de réparation sont particulièrement étudiés dans les cellules *bystander* dans l'objectif de comprendre les mécanismes induisant de la génotoxicité dans ces cellules. Des travaux ont par exemple démontré que des lignées déficitaires pour le système de réparation HR exhibaient, au niveau des cellules voisines de cellules irradiées, une diminution du taux de SCE¹ et de certaines aberrations chromosomiques, comparativement à la lignée sauvage correspondante (Nagasawa and Little, 1992; Nagasawa et al., 2005; Suzuki et al., 2004; Nagasawa et al., 2002). D'autre part, certains travaux menés sur des lignées déficitaires pour le système de réparation NHEJ ont mis en évidence une diminution du taux de mutations (Nagasawa et al., 2003), de micronoyaux (Kashino et al., 2004), de SCE (Nagasawa et al., 2005) et de certaines aberrations chromosomiques (Little et al., 2003; Nagasawa et al., 2005) dans les cellules voisines, ainsi qu'une augmentation du nombre de délétions partielles ou totales de gènes (Nagasawa et al., 2003). L'ensemble de ces considérations conduit à penser que le système de réparation des CDBs NHEJ est le système majoritairement sollicité dans les cellules *bystander*.

L'intérêt porté à l'induction des dommages à l'ADN dans les cellules *bystander* a conduit à l'utilisation de tests références permettant implicitement de comparer la survenue d'effet *bystander* dans différents types cellulaires, en fonction du temps, en fonction du type de rayonnement employé ou même en fonction de la dose absorbée. Le test le plus couramment utilisé aujourd'hui est l'observation de la phosphorylation de l'histone H2AX.

La phosphorylation de l'histone H2AX localisée aux sites de CDBs est recensé comme étant une réponse cellulaire précoce suite à l'irradiation par des rayonnements ionisants (Marchetti et al., 2006). Les histones H2AX phosphorylées au niveau de leur sérine 139 sont nommées γ H2AX et forment un foci constitué de plus d'une centaine de molécules encadrant le site d'une cassure double brin (Pilch et al., 2003). Dans les cellules *bystander* est généralement observé que le nombre de foyer γ H2AX dénombré par noyau est élevé (Burdak-Rothkamm et al., 2007; Hu et al., 2006; Sokolov et al., 2005; Yang et al., 2005). Ces foyers γ H2AX induits dans les cellules *bystander* colocalisent au niveau du dommage à l'ADN avec de nombreuses protéines impliquées dans les systèmes de réparation de dommages ou encore dans l'activation de voies de signalisation ; pour exemples, les protéines ATM et DNA-PK, MRE11, RAD50, NBS1 ou 53BP1² (Sokolov et al., 2005). Dans certains cas, lorsque les cellules sont en phase S du cycle cellulaire, ces foci peuvent

1. SCE = Sister Chromatide Exchange

2. P53 binding protein 1

impliquer la protéine ATR¹, au lieu des protéines ATM et DNA-PK (Burdak-Rothkamm et al., 2007).

2.4.2 La régulation du cycle cellulaire dans les cellules bystander

Suite à l'exposition aux rayonnements ionisants, de nombreuses activations et inhibitions de gènes ou de protéines vont intervenir dans la régulation du cycle cellulaire (voir 2.2.1 page 27). Ces mêmes mécanismes de régulation ont été observés dans les cellules *bystander*, mais leur complexité et leurs paradoxes associés à la variété de réponses cellulaires n'est ici que résumé dans les grandes lignes.

La protéine P53 a déjà été citée pour son rôle majeur dans la réponse cellulaire (Cuddihy and Bristow, 2004). Azzam *et al.* ont montré que dans des fibroblastes humains diploïdes, l'expression de P53, sa phosphorylation sur la sérine 15 et la protéine P21^{waf} étaient induites dans les cellules *bystander*, ceci menant à des arrêts transitoires du cycle cellulaire en phase G1 (Azzam et al., 2001, 1998, 2000, 2002b).

Plus particulièrement, la sur-régulation de P21^{waf} a été mise en évidence, suite à exposition de cultures à de faibles fluences de particules α , non pas dans toutes les cellules *bystander*, mais dans des petits ensembles de cellules bystander rassemblés en cluster isolés (Azzam et al., 1998, 2002b). Ces observations ont été mises en corrélation avec une expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle tels que cdc2, cyclin B1 et rad51 (Azzam et al., 1998).

Paradoxalement, d'autres travaux ont mis en évidence une prolifération accrue des cellules *bystander*, pouvant être associée parfois à une sous-expression des protéines P53 et P21^{waf}, elle-même concurrencée par une sur-régulation de CDC2 et PCNA (Gerashchenko and Howell, 2005; Iyer et al., 2000; Shao et al., 2002).

2.4.3 Les EROs dans réponse au voisinage

L'implication de ces espèces radicalaires dans la réponse au voisinage induite par les radiations ionisantes était déjà sous-jacente dans les tous premiers travaux portant sur l'effet *bystander* (Nagasawa and Little, 1992). Depuis, de nombreuses études impliquent indirectement les EROs dans la réponse *bystander* (Bishayee et al., 2001; Lorimore et al., 2001; Lyng et al., 2002a). Certaines précisent un rôle actif de ces radicaux, et en particulier l'oxyde nitrique (un radical stable), dans l'initiation de l'effet de voisinage (Shao et al., 2002; Matsumoto et al., 2001).

L'implication des EROs

Différentes approches ont été mises au point afin d'examiner le rôle des EROs dans la réponse *bystander*. L'approche la plus affectueuse consiste à observer la variation de cette réponse *bystander* (en terme de taux de mutations, d'induction de SCE ou de micronoyaux,

1. ATM and Rad3 related

d'augmentation du nombre de CDBs énumérées. . .) en présence d'agents piégeant les radicaux appelés en anglais *scavenger*. Ces *scavengers* peuvent être des tampons (comme le DMSO), des enzymes antioxydantes (SOD, Catalase. . .), ou même des antioxydants tel que le glutathion (pour revue, Azzam et al., 2003b).

Par exemple, la présence de DMSO permet une réduction de la fréquence de mutations observées dans les cellules bystander (Wu et al., 1999; Zhou et al., 2000), du taux de γ H2AX (Hu et al., 2006; Shao et al., 2003a) ou même de la mort cellulaire (Bishayee et al., 2001). De la même façon, le présence de SOD ou de catalase permet d'inhiber l'induction de SCE (Lehnert and Goodwin, 1997), mais peut aussi jouer un rôle sur la régulation des gènes comme l'inhibition de la sur-régulation des protéines P53 et P21^{waf} ou l'inhibition de la signalisation des kinases (Azzam et al., 2002b).

D'une manière globale, l'utilisation de différents *scavengers* a contribué à démontrer que les EROs étaient impliquées dans tous types de réponses *bystander* : variation de la viabilité (Bishayee et al., 2001; Lyng et al., 2006b), formation de micronoyaux (Konopacka and Rzeszowska-Wolny, 2006; Shao et al., 2003d), foci γ H2AX (Burdak-Rothkamm et al., 2007), activation de signalisations incluant régulation du cycle cellulaire, voie des MAP-kinases, activation de facteurs de transcriptions (Azzam et al., 2003b).

Une autre approche, plus directe mais moins facile d'utilisation, permet de mettre en évidence la présence d'EROs dans les cellules *bystander* ; il s'agit de l'utilisation de sondes fluorescentes, activées par la présence de radicaux (Shao et al., 2002, 2003d; Hafer et al., 2008; Lyng et al., 2002b). Ces sondes ont permis de démontrer dans certains cas la présence d'EROs dans les cellules non irradiées jusqu'à 24 h après irradiation.

Les EROs ont elles un rôle actif?

Parmi tous ces travaux relatifs à la réponse des cellules *bystander*, une étude plus détaillée de Azzam et al., 2002b, résumée en figure 2.12 page ci-contre, désigne une source potentielle de ROS : la NAD(P)H oxydase. L'inhibition de cette enzyme par l'ajout de diphénylène iodonium (DPI), entraîne une diminution de la réponse *bystander*.

Un premier bilan général dressé par Szumiel (2003) sur la mécanistique des événements conduisant à la génération d'EROs résume le rôle central des radicaux dans la réponse au voisinage (voir figure 2.13 page suivante).

Dans cette représentation, la contribution hypothétique de récepteurs membranaires était pour la première fois proposée par Nagasawa et al. (2002), qui démontrait que la présence de filipine¹ au cours de l'irradiation, annihile l'induction de SCE et diminue l'induction de mutations. Depuis, plusieurs études corroborent l'implication de la signalisation issue de la membrane dans la réponse au voisinage, sans pour autant en élucider clairement le mécanisme (Shao et al., 2004; Tartier et al., 2007; Burdak-Rothkamm et al., 2007).

1. Agent entraînant la disruption des radeaux de lipides riches en cholestérols.

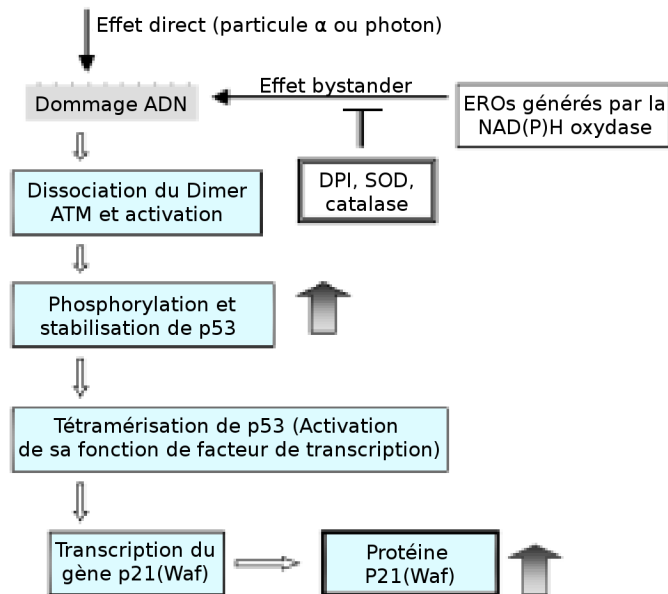
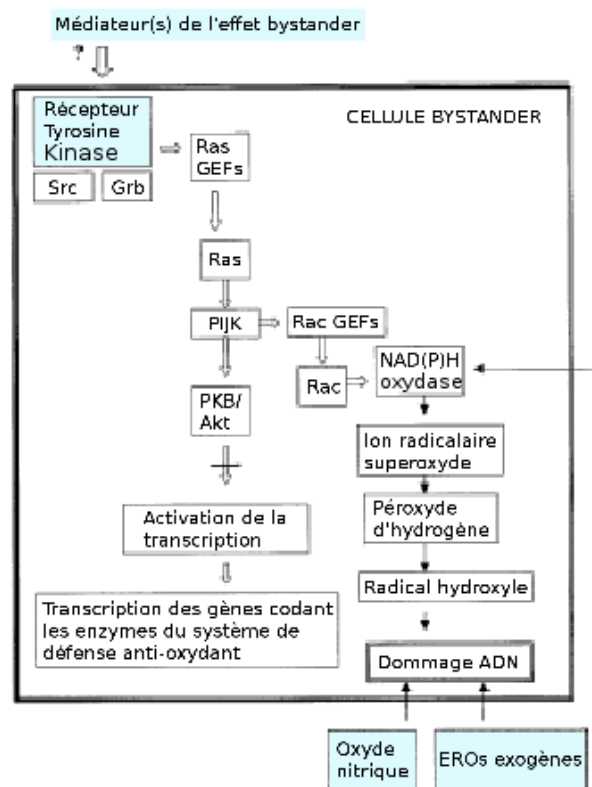


FIGURE 2.12 –

Évènements cellulaires impliqués dans la réponse au voisinage, d'après Azzam et al. (2002b).

FIGURE 2.13 – Signalisations cellulaires hypothétique conduisant à l'activation de la NAD(P)H oxydase et la génération de ERO dans les cellules *bystander*, d'après Szumiel (2003).



De même, l'identité de médiateurs potentiellement impliqués dans la transduction des signaux des cellules irradiées aux cellules *bystander* reste à être clarifiée. Il n'est d'ailleurs pas établi qu'il s'agisse de plusieurs médiateurs ou d'un médiateur universel. Cependant, quelques caractères peuvent être cités.

Tous les types cellulaires ne sont pas capables de produire un signal *bystander* mais ceci est indépendant de la capacité des cellules à répondre à des signaux *bystander* provenant d'un autre type cellulaire (Burdak-Rothkamm et al., 2007). Partant de cette observation, le seul candidat révélé à ce jour pour la fonction de médiateur est la cytokine TGF- β ¹.

TGF- β est sécrétée par les cellules irradiées et induit la génération d'EROs dans les cellules voisines *via* l'activation de la NAD(P)H oxydase (Shao et al., 2008b,a; Portess et al., 2007; Bauer, 2007). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-TGF- β , bloquant son action, entraîne l'inhibition de cette génération induite par TGF- β . (Thannickal et al., 1998, 2000; Thannickal and Fanburg, 1995).

Des travaux, plus récents, impliquent une autre source de production des EROs dans les cellules voisines : les mitochondries (Lyng et al., 2002b; Tartier et al., 2007). Dans la majorité de ces travaux, la génération de EROs est mise en évidence par l'observation de la variation du potentiel membranaire mitochondrial. Bien que la génération d'EROs mitochondriales soit souvent impliquée dans l'induction de l'apoptose, elle est aussi pour une part impliquée dans l'apparition de dommages à l'ADN dans les cellules voisines (Lyng et al., 2002b, 2000; Nugent et al., 2007). Cette activation mitochondriale, est parfois relatée comme étant dépendante de la signalisation membranaire (Lyng et al., 2002b; Tartier et al., 2007; Alphonse et al., 2002; Laethem et al., 2006).

Une dernière hypothèse, actuellement la plus soutenue (Szumiel, 2003), suppose que les EROs soient elles-mêmes médiatrices de l'effet de voisinage. En effet, quelque soit l'origine des radicaux oxygénés, la cascade de réaction en chaîne induite par la formation de radicaux libres entraîne la formation de certaines espèces telles que HO \cdot , O $_2^{\cdot}$, H $_2$ O $_2$, ou même NO \cdot . Ces espèces seraient suffisamment stables pour pénétrer à travers les pores membranaires des cellules et ainsi être relarguées dans le milieu ou voyager d'une cellule à l'autre. Dans ce dernier cas, la distance jusqu'au noyau d'une cellule *bystander* est suffisamment courte pour induire de nouvelles réactions en cascade, particulièrement en présence de fer (réaction de Fenton), conduisant à de multiples dommages à l'ADN (Szumiel et al., 1995; Seymour and Mothersill, 1999; Morgan and Sowa, 2007).

2.4.4 Le rôle du calcium

Mothersill *et al.* ont abondamment étudié l'induction de variations de survie des cellules voisines suite à l'irradiation γ , ce qui a abouti à démontrer que l'apoptose était un mode majeur de mort pour certains types cellulaires (Lyng et al., 2006b, 2002b; Mothersill and Seymour, 1997b; Mothersill et al., 2004). Dans ces cas, les EROs sont impliquées dans la diminution du potentiel mitochondrial et des niveaux intracellulaires du Ca $^{2+}$ dans ces cellules voisines.

1. Transforming growth factor β

La chélation du calcium et le blocage des canaux calciques voltage-dépendants entraînent une surexpression de cette apoptose radio-induite dans les cellules *bystander* (Lyng et al., 2006b). Plus récemment, Shao et al. (2006b) ont aussi reporté des variations de la réponse *bystander* induite par irradiation aux particules α dépendantes des flux calciques.

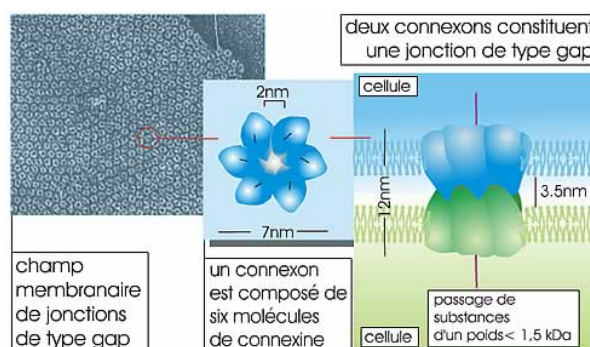
2.4.5 La communication cellulaire

Deux modes de communication semblent jouer un rôle primordial dans la transmission de signaux *bystander* ; la sécrétion de facteur soluble dans le milieu et le contact direct cellule à cellule *via* les jonctions communicantes (pour revue, Seymour and Mothersill, 1999).

Le rôle de facteurs solubles dans la transmission de signaux vers des cellules non ciblées par l'irradiation est établi notamment concernant l'induction d'effets clastogéniques. Ceci a précédemment été considéré dans les revues de Morgan (2003b) et Mothersill and Seymour (2006a). A faible dose d'irradiation, l'implication de facteurs solubles a été démontrée par le biais de méthodologies impliquant co-cultures de cellules sans contact physique et transfert de milieu de cultures cellulaires irradiées vers des cultures non irradiées (Sokolov et al., 2005). Bien que TGF- β puisse être un candidat à cette fonction de médiateur soluble (Shao et al., 2008a,b), la nature même des facteurs impliqués reste à être élucidée.

Le second type de communication implique les jonctions communicantes. De nombreuses études indiquent que ce type de jonction joue un rôle central dans la médiation des réponses *bystander* lorsque cellules ciblées et cellules voisines sont physiquement en contact.

FIGURE 2.14 – Connexons formant une jonction de type gap (www.ulyse.u-bordeaux.fr).



Les jonctions de type **gap** (jonctions communicantes) sont constituées de connexines, appartenant à une famille de protéines dont les membres sont désignés par leur poids moléculaire (connexine 32 à 50). Ce sont des protéines transmembraines, dont la chaîne polypeptidique traverse la membrane quatre fois. Les connexines s'assemblent en complexes de six unités qui forment un connexon ménageant ainsi un pore d'un diamètre de 2 nm environ. Les connexons présents dans les membranes de deux cellules voisines se placent en vis-à-vis, se lient entre eux et forment ainsi une jonction percée par un pore reliant les cytoplasmes des deux cellules contiguës. Ces jonctions peuvent être rassemblées

en champs membranaires (nexus) plus au moins étendus (figure 2.14 page précédente). Parmi les connexines composant les jonctions gap, la connexine 43 est la plus abondante.

L'utilisation d'inhibiteurs des jonctions gap, comme le lindane ou l'octanol, peut entraîner une diminution de l'induction de micronoyaux (Azzam et al., 2000; Shao et al., 2003d), du taux de mutations (Zhou et al., 2000, 2001, 2006), de l'expression de P53 et P21^{waf} (Azzam et al., 1998, 2000), de la formation de foci γ H2AX (Hu et al., 2006). Des résultats similaires ont été montrés par Azzam et al. (2001) avec l'utilisation de lignées déficitaires pour l'expression de la connexine 43. De plus, une sur-régulation de l'expression de la connexine 43 ainsi que des modifications de son état de phosphorylation ont été mises en corrélation avec une augmentation de la communication inter-cellulaire suite à l'irradiation (Azzam et al., 2003a; Edwards et al., 2004).

Synopsis

Chapitre 2

L'absorption des radiations dans la matière vivante entraîne de nombreux effets moléculaires et cellulaires tels que dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Suite à l'irradiation différentes voies de signalisation sont activées, notamment la signalisation issue de la membrane cytoplasmique (activant une série de MAP kinases) ou encore une signalisation activée par les dommages à l'ADN et mettant en jeux les protéines ATM ou ATR. Ces signalisations conduisent à deux réponses cellulaires principales chez les cellules de mammifères. La première consiste en l'activation de la transcription de gènes, dont les produits sont impliqués dans les blocages temporaires du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN. La deuxième réponse survient consécutivement à l'échec de la première, il s'agit de la mort programmée : l'apoptose radio-induite.

Pour des faibles doses de radiations, les phénomènes relatifs aux effets non-ciblés doivent être considérés. Ces phénomènes regroupent l'instabilité génomique, la radio-adaptation et l'effet de voisinage.

L'effet de voisinage, schématisé ci-dessous, est majoritairement mis en évidence par l'apparition de dommages à l'ADN dans les cellules voisines de cellules irradiées, mais non directement ciblées par l'irradiation. Les signaux relatifs à cet effet peuvent être transmis d'une cellule à l'autre par deux types de communications cellulaires : *via* le milieu ou *via* les jonctions communicantes. Les espèces réactives de l'oxygène (nommée EROs) semblent jouer un rôle actif dans la signalisation de cet effet de voisinage.

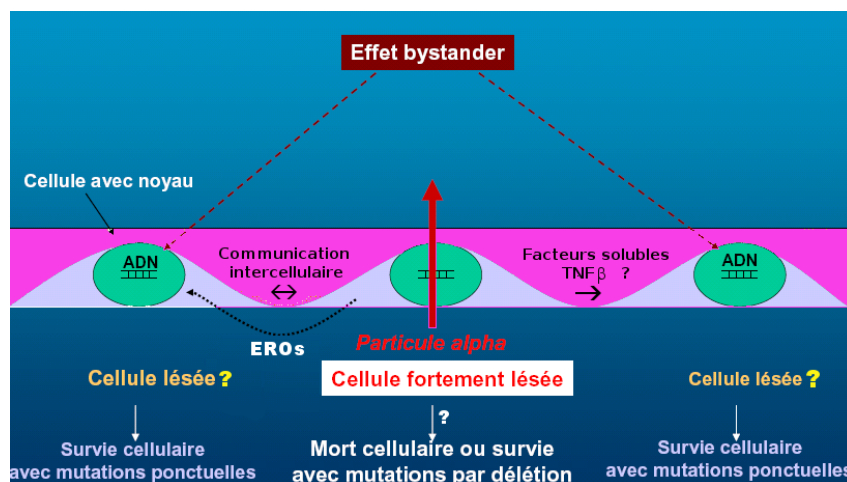


FIGURE 2.15 – L'effet de voisinage. Schématisé selon Morgan and Sowa (2005, 2007).

3

Radiobiologie et microfaisceaux

Sommaire

3.1	(Micro)faisceaux et accélérateurs de particules	53
3.1.1	Domaines d'applications	53
3.1.2	Les accélérateurs linéaires	54
3.1.3	Les accélérateurs circulaires	55
3.2	L'impact des microfaisceaux en biologie des radiations . .	56
3.2.1	Les moyens d'irradiation à faible dose	56
3.2.2	Un intérêt grandissant pour les microfaisceaux	58
3.2.3	Les différentes installations	58
3.3	Conception des installations d'irradiation par microfais-	
	ceaux pour la radiobiologie	60
3.3.1	Description d'une installation type	60
3.3.2	La formation du faisceau	61
3.3.3	La mise à l'air du faisceau	62
3.3.4	Observation et Repérage des cellules	62
3.3.5	La numération des particules délivrées	64
3.3.6	Maintien d'échantillons biologiques	66

DANS CE TROISIÈME CHAPITRE l'impact de l'utilisation des microfaisceaux pour des applications en radiobiologie est présentée en prenant compte des avantages apportés par la technique pour l'irradiation comparativement aux méthodes usuelles. Dans un second temps, ce chapitre détaille d'un point de vue technique la composition des différentes installations d'irradiation par microfaisceaux existant à travers le monde afin de dresser un bilan des conditions de développement requises pour l'élaboration de tels systèmes d'irradiation spécifiquement dédiés à la radiobiologie. Ce chapitre est représentatif du domaine à l'interface entre la physique et la biologie dans lequel se place l'étude de la réponse cellulaire suite à l'irradiation par microfaisceaux.

3.1 (Micro)faisceaux et accélérateurs de particules

Les accélérateurs de particules sont des instruments qui utilisent des champs électriques et/ou magnétiques pour amener des particules chargées électriquement (des ions) à des vitesses élevées. En d'autres termes ils communiquent de l'énergie aux particules.

En 2004, plus de 15 000 accélérateurs étaient dénombrés dans le monde ((Ragnar, 2005)). Une centaine seulement sont de très grandes installations, nationales ou supranationales (par exemple le CERN). Les machines électrostatiques de type industriel composent plus de 80 % du parc mondial des accélérateurs industriels d'électrons. De très nombreux petits accélérateurs linéaires sont utilisés en médecine (radiothérapie anti-tumorale).

3.1.1 Domaines d'applications

Les accélérateurs ont des applications aussi variées que

- la physique nucléaire (production de neutrons par exemple), pour la recherche fondamentale sur les particules élémentaires des hautes énergies,
- le domaine médical, pour le traitement des cancers par radiothérapie,
- le domaine militaire, en particulier pour la simulation des armes nucléaires.

En physique fondamentale, ils servent à accélérer des faisceaux de particules chargées (électrons, positons, protons, antiprotons, ions...) pour les faire entrer en collision avec la matière et étudier les particules élémentaires générées au cours de cette collision. Les différents champs de recherches faisant intervenir les accélérateurs de particules sont décrits dans le tableau 3.1 page suivante.

L'énergie des particules accélérées se mesure en électron-volts (eV) mais les unités sont souvent le million ($1 \text{ MeV} = 10^6 \text{ eV}$), le milliard d'électronvolts ($1 \text{ GeV} = 10^9 \text{ eV}$). La physique des hautes énergies (ou subnucléaire ou des particules élémentaires) se définit justement à partir du GeV et au delà.

On distingue deux grandes catégories : les accélérateurs linéaires et les accélérateurs circulaires.

Recherche	Méthodes	Accélérateurs
Physique des particules	Collisions	Synchrotrons, collisionneurs à protons ou électrons
Physique nucléaire	Collisions noyau-noyau	Accélérateurs d'ions lourds : synchrotron, cyclotron, Tandem, Linac
Physique atomique	Collisions atomiques	Accélérateurs d'ions lourds : synchrotron, cyclotron, Tandem, Linac
Matière condensée	Diffraction de rayons X	Rayonnement synchrotron
Matière condensée	Diffusion de neutrons	Linac à proton
Biologie, chimie	Cristallographie des protéines, des virus	Rayonnement synchrotron
Physique des matériaux	Analyse par activation, spectrométrie de masse, analyse élémentaire	Van de Graaff, Tandem

TABLE 3.1 – Application des accélérateurs pour la recherche.

3.1.2 Les accélérateurs linéaires

Les accélérateurs linéaires sont plus anciens que les accélérateurs circulaires ; ils sont apparus dès 1928 avec l'accélérateur linéaire de Wideroë, dont le principe est repris par Sloan et Lawrence aux États-Unis à partir de 1931. En France, au début des années 1960, on a construit à Orsay en Essonne un accélérateur linéaire et son Anneau de Collision (ACO) dont l'énergie était de l'ordre du GeV. Les accélérateurs linéaires ne permettaient pas, initialement, de produire des faisceaux d'aussi grande énergie que les accélérateurs circulaires. En revanche ils ont de nombreux avantages. En effet, la géométrie est « ouverte », c'est à dire que l'on peut envoyer ou extraire le faisceau facilement et un faisceau de flux élevé pourra être transporté avec les technologies actuelles. Ils sont souvent utilisés comme injecteurs de faisceaux dans les grandes structures (collisionneurs circulaires), et maintenant développés comme éléments de grands collisionneurs linéaires. Actuellement, le plus grand accélérateur linéaire au monde est celui de Stanford aux États-Unis.

On trouve plusieurs techniques d'accélération :

Les accélérateurs électrostatiques Une haute tension statique est appliquée entre des électrodes successives produisant ainsi un champ électrique statique.

- Les multiplicateurs de tension (combinaison en cascade de condensateurs et de redresseurs) de type Greinacher ou Cockcroft et Walton permettent d'obtenir des hautes tensions qui ont les caractéristiques des machines proprement électrostatiques (Singletron , Tandetron de la société HVEE). L'énergie acquise par les

particules est égale, en électron-volts, au produit de la charge électrique et de la différence de potentiel.

- Le microscope électronique est le plus connu des accélérateurs électrostatiques. L'accélération jusqu'à quelques centaines de KeV fournit des longueurs d'ondes adaptées aux dimensions des cellules, des virus, des microcristaux et des plus grosses molécules.
- Le générateur électrostatique le plus typique est le générateur de Van de Graaff : la différence de potentiel est de quelques MV (20 MV pour les accélérateurs-tandem de type Vivitron ou Laddertron ou Pelletron). Pour accroître l'énergie à tension constante, on ne peut qu'augmenter la charge électrique. Mais les sources d'ions multichargés sont, en général, complexes, et il est peu commode de les loger dans une électrode haute tension. L'accélérateur électrostatique tandem (1958) apporte une solution à ce problème.

Les accélérateurs linéaires à radiofréquences de type Widerö (1928) ou Alvarez (1947). Couramment appelés LINAC (éléments disposés en ligne droite) : la trajectoire des particules est toujours rectiligne, mais le champ électrique est de haute fréquence. Les sources alternatives Haute Fréquence utilisées sont presque toujours des klystrons (tubes amplificateurs hyperfréquences) dont la puissance de crête peut atteindre 60 MW. Les particules sont accélérées par impulsions successives convenablement synchronisées sans avoir à isoler des différences de potentiel équivalentes à l'énergie finale. Le faisceau en passant dans une suite de cavités où règne un champ électrique alternatif va pouvoir atteindre une énergie de quelques centaines de MeV. On distingue encore deux types selon qu'il s'agit des accélérateurs d'ions (basses énergies) ou d'électrons (haute énergie).

3.1.3 Les accélérateurs circulaires

Les accélérateurs circulaires détiennent le record d'énergie. En effet, l'énergie reçue par mètre de trajectoire, c'est-à-dire l'intensité du champ électrique accélérateur, est limitée par des facteurs physiques et techniques. En *enroulant* la trajectoire, on obtient l'équivalent d'un accélérateur rectiligne ayant, non pas des kilomètres, mais des milliers de kilomètres de longueur.

Parmi les accélérateurs circulaires, deux catégories se distinguent. Les accélérateurs employant un champ magnétique fixe (et un aimant massif) et où les trajectoires sont en spirales correspondent aux cyclotrons (E. Lawrence, 1929) et aux synchrocyclotrons (conçu à Berkeley en 1946). Au contraire, dans les synchrotrons (E. Mc Millan et V. Veksler), le champ magnétique varie pendant l'accélération, de telle sorte que celle-ci a lieu sur un cercle invariable et que l'électroaimant (annulaire) est, à énergie égale, considérablement réduit. Les synchrotrons sont donc, pour des raisons économiques, les accélérateurs permettant d'avoir des orbites de très grand rayon.

3.2 L'impact des microfaisceaux en biologie des radiations

La première utilisation de microfaisceaux pour la radiobiologie date des années 1950, lorsque Bloom et Zirkle développent et utilisent des microfaisceaux de basses énergies pour l'étude des effets des radiations sur le cycle cellulaire (Bloom and Zirkle, 1954; Zirkle and Bloom, 1953). Oubliés depuis, l'intérêt des biologistes pour les microfaisceaux renaît dans les années 1990 avec la découverte des effets non-ciblés à faible dose d'irradiation.

3.2.1 Les moyens d'irradiation à faible dose

L'exposition *in vitro* de systèmes cellulaires (monocouches, microcolonies ou tissus) à faibles doses de rayonnements peut s'effectuer selon deux approches distinctes, développées ci-dessous. L'irradiation en champ large est l'approche conventionnelle. L'irradiation par microfaisceau apporte une meilleure maîtrise de l'irradiation.

Irradiation en champ large

La première approche consiste à exposer uniformément l'ensemble des cellules à une dose déterminée de rayonnements, en particulier de rayonnements électromagnétiques (Rayon X ou γ) ou de particules α . Les techniques d'irradiation en question relèvent de l'utilisation de sources ou de faisceaux irradiant en champ large (macrofaisceaux). Les effets radio-induits peuvent alors être reliés directement à la dose reçue par le système. Autrement, à partir de loi de distribution statistique des impacts dans la population de cellules, le nombre de cellules touchées par n particules peut être déterminé.

Cependant, l'irradiation étant dans ce cas uniformément répartie au hasard, les cibles de l'irradiation ne peuvent pas être identifiées. Afin de permettre un contrôle de l'irradiation, en terme de localisation, différentes méthodes ont été développées (pour revue, Hill et al., 2006). Le moyen le plus classiquement mis en œuvre, représenté en figure 3.1 page ci-contre, consiste à couper la trajectoire des radiations *via* des masques de géométries variables permettant une alternance de zones cellulaires irradiées et non irradiées. Des masques de tailles micrométriques peuvent permettre une irradiation au niveau cellulaire, voire sub-cellulaire. Une méthode complémentaire, moins utilisée, consiste à mettre en place un système de co-culture séparant physiquement les cellules irradiées des cellules non-irradiées (voir figure 3.2 page suivante).

Irradiation par microfaisceaux

La deuxième approche consiste à irradier les cellules par une faible fluence de particules chargées, en majorité des α . Ainsi, une faible proportion de cellules est traversée par les particules présentant un fort TEL et une trace très dense. Dans ce cas, la distribution de la dose n'est pas uniforme dans la population cellulaire, mais s'effectue uniquement dans

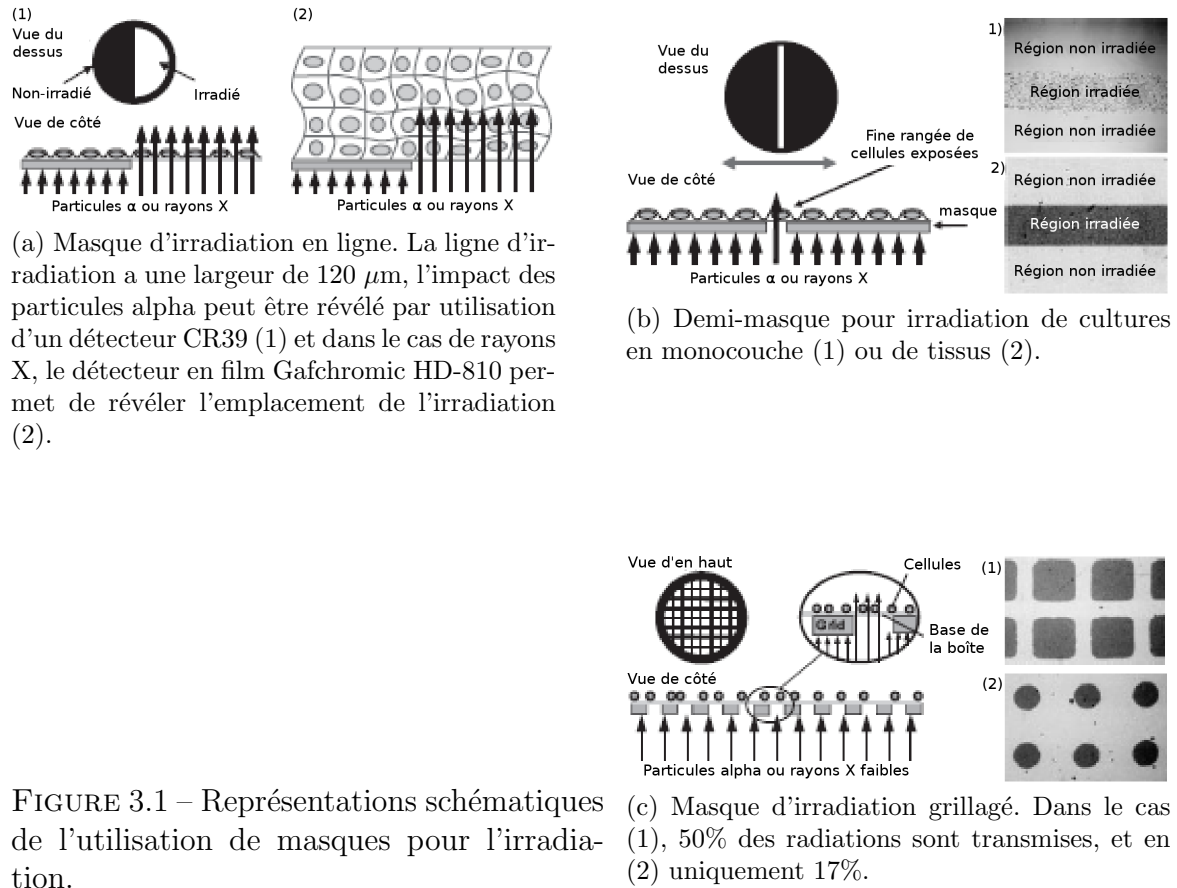
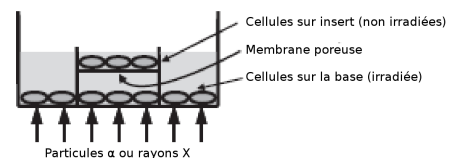


FIGURE 3.1 – Représentations schématiques de l'utilisation de masques pour l'irradiation.

FIGURE 3.2 – Représentation d'un système d'irradiation en co-culture.



la faible proportion de cellules traversées par les particules. Alors, les effets radio-induits peuvent être reliés à un nombre de particules par cellule ou à la dose correspondante. La précision des microfaisceaux permet de contrôler :

- La fraction de cellules traversées par les particules,
- Le nombre de particule(s) pour chaque cible,
- La localisation de la trace au niveau cellulaire ou sub-cellulaire.

3.2.2 Un intérêt grandissant pour les microfaisceaux

La force initiale de ces installations est leur capacité à délivrer un nombre de particules donné à une cellule individuelle. Le ciblage d'une cellule unique au sein d'une population et l'analyse des dommages induits cellule par cellule permettent une irradiation caractérisée du point de vue de la qualité des radiations et de la définition de la cible et de la dose. De cette façon, les dommages induits par les radiations peuvent être directement corrélés à l'énergie, au nombre d'ions, au type cellulaire ainsi qu'au compartiment cellulaire irradié.

Les développements technologiques en informatique et en imagerie rendent possible la conception de système de micro alignements, automatiques et rapides, nécessaires pour des applications en radiobiologie. Cette maîtrise des protocoles d'irradiation prend une importance tout particulière dans le cadre de l'étude des risques associés lors d'expositions environnementales à des particules α émises par des isotopes radioactifs naturels (radon). Depuis que les premiers microfaisceaux modernes sont opérationnels, leur utilisation pour l'amélioration des connaissances concernant les cibles et les signalisations requises dans les réponses radio-induites est donc parfaitement appropriée. L'avantage majeur des microfaisceaux pour l'irradiation de cellules est de permettre la détermination des mécanismes moléculaires conduisant à une réponse au voisinage.

En conséquence, la communauté scientifique développe un engouement certain pour l'utilisation de telles installations. Un signe évident de cet intérêt est le grand nombre d'équipements de microfaisceau déjà existant ou en cours de développement à travers le monde (Brenner and Hall, 2002; Gerardi, 2006).

Peu de ces équipements sont totalement opérationnels et peuvent exercer de façon régulière. Actuellement, un vingtaine de laboratoires à travers le monde se consacrent au développement de microfaisceaux à particules chargées dans un but d'études radiobiologiques. Ceci correspond grossièrement à un doublement du nombre de projets depuis le début du nouveau siècle. Ceci est représenté par les tableaux 3.3 page ci-contre qui dressent un bilan des microfaisceaux opérationnels en 2002 puis en 2006.

3.2.3 Les différentes installations

La conception des microfaisceaux pour la radiobiologie a énormément évolué depuis le milieu des années 1990. Cette évolution, rapide, aboutit à la distinction de différents types d'installations.

3.2. L'impact des microfaisceaux en biologie des radiations

Laboratoires	TEL	Opérationnel	Pratique de biologie
Gray cancer institute, London, UK	bas et haut	oui	oui
Université de Colombia I, New York, USA	haut	oui	oui
Université de Colombia II, New York, USA	bas, très haut	non	non
JAERI, Takasaki, Japon	haut	oui	oui
PNL, Richland, Washington, USA	bas	oui	non
PTB, Braunschweig, Allemagne	bas, haut	oui	non
CENBG, Bordeaux, Gradignan	bas, haut	oui	non
INFN, Naz Legnaro-Padova, Italie	bas, haut	oui	non
Université de Leipzig, Allemagne	bas, haut	oui	non
MIT, Boston, USA	bas, haut	oui	non
Université de Munich, Garching, Allemagne	bas, haut	oui	non
INFN, Sez di L'Aquila, Italie	X doux	non	oui
INFN, Sez di Padova, Italie	haut	non	oui
LBL Berkeley, USA	très haut	non	non

(a) État des installations produisant des microfaisceaux en 2002 d'après Brenner and Hall (2002).

Laboratoires	Direction du faisceau	Formation du faisceau	Pratique de biologie
Université de Colombia I, New York, USA	vertical	collimation	oui
Gray cancer institute, London, UK	vertical	collimation	oui
INFN, Naz Legnaro-Padova, Italie	horizontal	collimation	en cours
Institut de physique des plasma, Hefei, China	vertical	collimation	en cours
JAERI, Takasaki, Japon	vertical	collimation	oui
MIT, Boston, USA	vertical	collimation	en cours
Université du Texas, USA	vertical	collimation	en cours
CENBG, Bordeaux, Gradignan	horizontal	focalisation	oui
Université de Colombia II, New York, USA	vertical	focalisation	oui
GSI, Darmstad, Allemagne	horizontal	focalisation	oui
Université de Krakow, Pologne	horizontal	focalisation	en cours
LIPSION, université de Leipzig, Allemagne	horizontal	focalisation	en cours
LBL Berkeley, USA	horizontal	focalisation	en cours
UNiversité de Lund, Suède	horizontal	focalisation	en cours
PTB, Braunschweig, Allemagne	vertical	focalisation	oui
SNAKE, Université de Munich	horizontal	focalisation	oui
SPICE, NIRS, Chiba, Japon	vertical	focalisation	en cours

(b) État des installations produisant des microfaisceaux en 2006 d'après Gerardi (2006).

FIGURE 3.3 – État des installations produisant des microfaisceaux en 2002 et 2006.

Le premier type de microfaisceaux d'ions utilisés en radiobiologie et encore actuellement opérationnels sont constitués de lignes horizontales, prenant avantage d'installations précédemment existantes. Elles correspondent à une adaptation d'équipements qui étaient d'abord utilisés pour l'analyse élémentaire. Comme des exemples de ce type d'installation on peut citer : le GSI (Darmstadt, Allemagne), le INFN-LNL (Legnaro, Italie), l'université de Krakow (Pologne), le LIPSION (université de Leipzig, Allemagne), l'université de Lund (Suède), le SNAKE (l'université de Munich, Allemagne) et le CENBG (Bordeaux, France). A l'exception du INFN-LNL qui est fondé sur collimation du faisceau, les instruments précédemment cités sont fondés sur focalisation du faisceau.

Généralement, les microfaisceaux **spécifiquement** développés pour des études radiobiologiques, correspondant à un deuxième type d'installation, sont verticaux et fondés sur collimation ; par exemples, les équipements du *Gray cancer institute* (GCI, Londres, Royaume-Uni) et l'Université de Columbia I (New York, Etats-Unis) sont montés de cette façon, avec un microfaisceau irradiant les échantillons par le dessous. Le JAERI (Takasaki, Japon) est un autre exemple de microfaisceau vertical fondé sur collimation mais irradiant par le dessus. La conception verticale est plus adaptée à la pratique de la biologie cellulaire. Le choix de la collimation est en général dépendant de contraintes d'encombrement.

Les récents équipements de Columbia University II et PTB (Braunschweig, Allemagne) sont quant à eux des exemples de microfaisceaux verticaux fondés sur focalisation et irradiant respectivement du dessus et du dessous, la focalisation permettant une précision de ciblage (sous vide) de l'ordre sub-micrométrique.

3.3 Conception des installations d'irradiation par microfaisceaux pour la radiobiologie

L'ensemble des installations existantes permettent aujourd'hui d'avoir du recul sur la conception de microfaisceaux dédié à la radiobiologie, dressant ainsi un récapitulatif des avantages et inconvénients de chaque installation (pour revue, Bigelow et al., 2008).

3.3.1 Description d'une installation type

Différentes conditions de développement doivent être prises en considération pour le développement d'une plateforme d'irradiation par microfaisceau d'ions. Ces conditions sont résumées sous forme de schéma dans la figure 3.4 page suivante.

Le faisceau de particules doit atteindre une taille micrométrique, à l'échelle de la cellule. Afin de travailler avec des cultures vivantes, le microfaisceau doit être extrait à l'air. Les cellules sont en général cultivées sur des supports adaptés aux conditions biologiques mais aussi à la géométrie du faisceau. De manière générale, les systèmes de reconnaissance des cibles, de déplacement des cultures et de contrôle du faisceau sont gérés automatiquement.

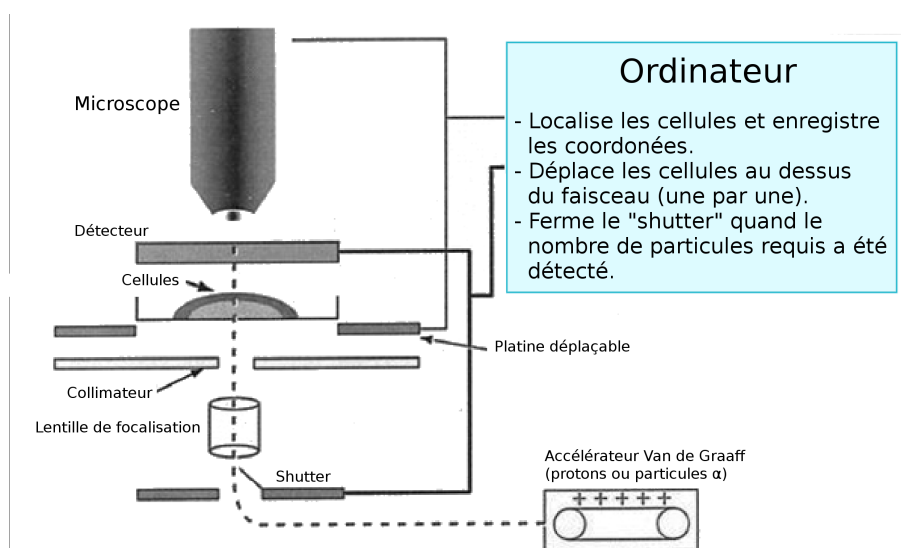


FIGURE 3.4 – Représentation schématique d'une installation d'irradiation par microfaisceau d'ions, adaptée de Hall and Hei (2003).

3.3.2 La formation du faisceau

Afin de limiter spatialement l'irradiation à une cellule parmi une population ou même à un niveau subcellulaire, le faisceau de particules chargées doit être réduit à une taille micrométrique, voire submicrométrique. Les deux méthodes possibles sont la **collimation** ou la **focalisation** du faisceau.

La microcollimation permet une extraction facilitée du faisceau à l'air et permet la réduction du débit de dose à un niveau cohérent avec les faibles doses d'irradiation. La principale limitation des faisceaux collimatés mécaniquement est la dispersion des particules qui augmente avec le diamètre interne du collimateur. Limiter cette dispersion est donc indispensable pour améliorer la qualité du faisceau ; les principaux paramètres modulables sont liés au matériau composant le collimateur et à son alignement avec le faisceau.

Par exemples, au GCI a été mis en place un capillaire enserré dans un système d'alignement automatique afin de le maintenir à la verticale (Folkard et al., 1997a,b). Ce capillaire, ayant une longueur de 1 mm, est constitué de verre et les parois sont recouvertes de bore. A l'université de Colombia, le système de microcollimation se compose d'une paire d'ouvertures (de 5 et 6 μm de diamètre) forées au laser dans une feuille en acier inoxydable épais de 12,5 μm couplé à un système automatique d'alignement (Randers-Pehrson et al., 2001). Au INFL-LNL, le faisceau est collimaté dans l'air par le biais d'un trou de 2 ou 5 μm de diamètre, foré dans un matériau en tantale (Gerardi et al., 2005). D'une manière générale, la collimation mécanique permet d'obtenir des faisceaux d'un diamètre de 5 μm .

La focalisation peut être réalisée magnétiquement ou électrostatiquement et permet l'ob-

tention des faisceaux les plus étroits, de dimension sub-micrométrique, avec une haute résolution spatiale sous vide. Cependant lors de l'extraction à l'air du faisceau, ces capacités sont légèrement dépréciées (mais restent meilleures que la collimation). De plus, les faisceaux focalisés sont caractérisés par une forte intensité de courant, ce qui est indispensable pour les applications non-biologiques comme l'analyse élémentaire, mais problématique dans le cas d'irradiation à faible dose.

L'installation d'une focalisation est aussi extrêmement coûteuse financièrement et spatialement. L'espace requis pour la mise en place de lentilles de focalisation justifie le fait que l'option est moins utilisée depuis la mise en place de lignes verticales (deuxième type de microfaisceaux dédiés à la radiobiologie).

Néanmoins ces conditions permettent de réaliser des irradiations avec un faisceau ayant un diamètre de 1 μm au PTB (Greif et al., 2004) et au SNAKE (Dollinger et al., 2005). Une taille sub-micrométrique a déjà été produite à l'université de Columbia II et au GSI (Fischer et al., 2003; Heiss et al., 2004). Sous vide, un faisceau de 50 nm a même été obtenu au LIPSION (Fiedler et al., 2004; Reinert et al., 2004).

3.3.3 La mise à l'air du faisceau

L'étude de la réponse cellulaire à l'irradiation nécessite de travailler avec des cellules vivantes ; il est donc impératif d'extraire le faisceau, voyageant sous vide, à l'air. Pour cela, différents systèmes ont déjà été mis au point.

Au JAERI, l'extraction du faisceau est réalisée *via* l'utilisation de multiples systèmes de pompes différentielles, gérant le passage du vide à l'air, alors que le faisceau voyage dans une section de lignes extrêmement étroites (Funayama et al., 2008; Kobayashi et al., 2003).

La majorité des autres installations utilise une fenêtre, extrêmement fine, de l'ordre du μm , constituée de polymères tels que le mylar, le kapton ou encore le polypropylène. Par ailleurs, certaines fenêtres peuvent atteindre des épaisseurs de l'ordre de la centaine de nm, dans le cas de membrane en nitrure de silicium. Ces fenêtres supportent un différentiel de pression de l'ordre de 1 atmosphère. Les fenêtres en nitrure de silicium, aujourd'hui disponibles commercialement, est le type de fenêtre le plus prisé car il permet l'extraction du faisceau avec une dispersion négligeable des particules lors du passage du faisceau. Ces fenêtres sont par exemple utilisées à l'université de Columbia II (Bigelow et al., 2005), au GSI (Heiss et al., 2004), à l'université de Krakow (Veselov et al., 2006), à l'université de Lund (Shariff et al., 2005b) et au LIPSION (Reinert et al., 2004).

3.3.4 Observation et Repérage des cellules

Différents systèmes d'observations

Afin d'irradier une cellule unique parmi une population et d'analyser la réponse cellulaire cellule par cellule, il est nécessaire d'identifier avec exactitude la cible en question. A ce jour, trois approches sont couramment utilisées pour la reconnaissance des cellules :

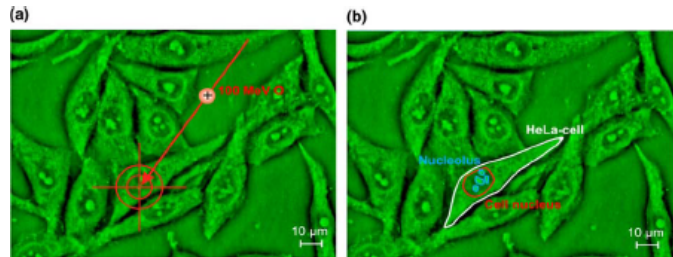
1. la coloration des cellules couplée à l'utilisation de la microscopie de fluorescence,

2. l'utilisation de la microscopie optique par contraste de phase,
3. la microscopie dite en phase quantitative.

La première approche consistant à colorer les cellules avec un colorant vital est la plus souvent recensée. Cette méthode est par exemple mise en place à l'université de Colombia (Randers-Pehrson et al., 2001), au GCI (Folkard et al., 1997a,b), au GSI (Heiss et al., 2004) et au JAERI (Kobayashi et al., 2003). Les colorants cellulaires, majoritairement fluorescents, sont utilisés pour leur capacité à se fixer spécifiquement à certaines molécules, ce qui permet de visualiser une cibles sub-cellulaire déterminée. Les cellules sont dans ce cas visualisées *in situ* grâce à un microscope à épifluorescence couplé généralement à une caméra CCD, permettant de réaliser des acquisitions d'images, et à un logiciel approprié, permettant la mesure et la sauvegarde des coordonnées de chaque cible. La reconnaissance des cellules est donc réalisée automatiquement sur la ligne d'irradiation.

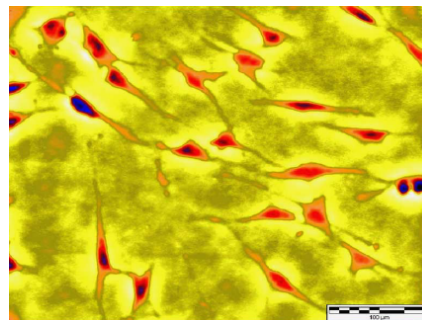
L'utilisation de la microscopie optique par contraste de phase peut être une solution moins invasive car dans ce cas, l'utilisation de colorants et d'UV est évitée (figure 3.5). De tels systèmes ont été adoptés au INFN-LNL (Gerardi et al., 2005), à l'université de Lund (Elfman et al., 2005; Shariff et al., 2005a,b) et au SNAKE (Dollinger et al., 2005). Par contre, dans ce genre d'installation, la reconnaissance des coordonnées des cibles n'est pas réalisée *in situ* et l'enregistrement des coordonnées est en général semi-automatique car nécessite une intervention manuelle.

FIGURE 3.5 – Reconnaissance des cibles *via* microscopie par contraste de phase au SNAKE. (a) Visualisation des cellules et repérage des coordonnées de la cible. (b) Caractéristiques visibles d'une cellule en contraste de phase.



La troisième méthode regroupe les avantages des deux précédentes. La microscopie en phase quantitative permet une reconnaissance cellulaire sans ajout de colorants, sans UV et de manière automatique *in situ*. L'acquisition d'images est obtenue dans ce cas par l'acquisition de trois images successives : une correspondant au plan focal, et deux défocalisées positivement et négativement par rapport au plan focal (figure 3.6 page suivante). Des logiciels spécialisés permettent de traiter ce genre de données (distribués par exemple par IATA, Melbourne, Australie). Des installations comme l'université de Colombia (Bigelow et al., 2005), le GSI (Heiss et al., 2004) et l'université de Krakow (Veselov et al., 2005, 2006) utilisent ce système.

FIGURE 3.6 – Reconstitution d’une image en microscopie en phase quantitative permettant la visualisation des cellules sans colorant spécifique. La représentation utilisant de fausses couleurs permet de distinguer les cellules (Bigelow et al., 2005).



La vitesse : un paramètre important

La vitesse de reconnaissance est un critère influent dans l’amélioration des systèmes d’irradiation par microfaisceaux. La reconnaissance automatisée des cibles permet dans certains cas un débit d’irradiation de 2000 à 15000 cellules par heure (Ce qui est le cas au GCI, à l’université de Colombie et au PTB). Ceci permet d’observer des événements cellulaires dont la fréquence d’apparition est de l’ordre de 10^{-4} , comme les mutations par exemple. Avec des systèmes semi-automatiques, le débit d’irradiation est en général inférieur à 1000 cellules par heure. Ceci est satisfaisant pour des études portant sur l’induction de micronoyaux, l’expression de protéines, la mort cellulaire. . .

L’amélioration de la vitesse d’irradiation est modulable selon différents paramètres. La mise en place d’un système de translation portant les cultures cellulaires afin de déplacer les cibles au dessus du microfaisceau est un des moyens les plus couramment utilisés, particulièrement dans le cas de faisceaux collimatés. De tels systèmes de déplacement gérés automatiquement apportent un avantage sur la rapidité d’exécution d’une irradiation, mais aussi jouent sur la précision (les déplacements pouvant être gérés au micromètre près) ainsi que sur la reproductibilité.

D’autre part, la mise en place de systèmes permettant un déplacement local du faisceau est aussi un moyen d’améliorer la vitesse du système. Ceci est fréquemment utilisé dans le cas de faisceaux focalisés, ce qui est d’ailleurs un de leurs avantages.

3.3.5 La numération des particules délivrées

La capacité de détecter et de contrôler le nombre de particules délivrées à une cellule unique est caractéristique de la technique d’irradiation par microfaisceaux . Les irradiations avec un nombre prédéterminé d’ions nécessite une haute capacité de détection ainsi qu’une grande reproductibilité. Dans le but de stopper le faisceau après le passage du nombre défini de particules, le système de détection est souvent couplé à un système de déflexion contrôlant le faisceau. Le détecteur envoie un signal aux déflecteurs lorsque le nombre pré-sélectionné d’ions par cellule a été délivré. La détection des particules peut être réalisée selon deux méthodes ; soit avant la culture cellulaire, soit après.

Placer le détecteur entre l’extraction du faisceau et la cible impose l’utilisation de détec-

teurs en transmission très fins afin de minimiser les conséquences sur la qualité du faisceau. En effet, les particules traversant le détecteur perdent une partie de leur énergie et sont alors légèrement déviées de leur trajectoire ; la résolution spatiale du faisceaux est affectée. L'avantage d'une telle méthode est que la culture cellulaire ne subit pas de contrainte directe lors de la mesure. Les scintillateurs en plastique très fins sont généralement utilisés dans cette configuration. Ils produisent au passage des particules un signal luminescent. La détection de ce faible signal requiert l'utilisation d'un photomultiplicateur performant et d'un environnement vierge de toute lumière parasite.

Ce type d'approche a été développé au GCI (Folkard et al., 1997a,b) où le collimateur est surmonté au niveau de la sortie du faisceau par une feuille de mylar de 3 μm pour l'extraction à l'air puis par une feuille d'aluminium de 4 μm (limitant le scintillement du verre composant le collimateur) et par le scintillateur en plastique d'une épaisseur de 18 μm (type Bricon BC400). La lumière émise par le scintillateur est détectée par un photomultiplicateur monté sur la tourelle d'objectifs d'un microscope. L'ensemble du système est englobé dans une boîte étanche à la lumière afin de limiter le bruit de fond provenant de la lumière environnante. La capacité de détection de ce système est supérieur à 99% avec moins de 1% de faux positifs pour les particules $^1\text{H}^+$ et $^3\text{He}^{2+}$. La détection basée sur l'utilisation de scintillateur est aussi mise en place au JAERI (Kobayashi et al., 2003) et au PTB (Greif et al., 2004). Le détecteur peut aussi être à gaz basse pression. Ce type de détecteur associé à la membrane de nitrure de silicium a été développé au CENBG (Barberet et al., 2004).

La deuxième configuration pour la détection de particules consiste à placer le détecteur au dessus de la culture cellulaire (figure 3.7a page suivante). Dans ce cas, l'énergie des particules doit être suffisante pour traverser les cellules. Dans certains laboratoires cette méthode nécessite le retrait de milieu de culture au moment de l'irradiation. Ceci présente par contre l'avantage de ne pas perturber la qualité du faisceau. Cette géométrie à été adoptée à l'université de Colombia (Randers-Pehrson et al., 2001), à l'INFN-LNL (Gerardi et al., 2005), au LIPSION (Fiedler et al., 2004), à l'université de Lund (Nilsson et al., 2006) et au SNAKE (Dollinger et al., 2005). Différents types de détecteurs peuvent être utilisés (détecteur en silicium, détecteur à scintillation, détecteur à gaz ...).

Au sein de l'installation du GSI, comme les ions carbone n'ont pas assez d'énergie pour traverser l'épaisseur de 2 mm de la chambre maintenant les cellules, aucun détecteur ne peut être mis en place. Une troisième méthode est donc utilisée dans ce cas. Un channeltron est monté sous la fenêtre d'extraction du faisceau, au dessus du collimateur, sous vide pour détecter les électrons secondaires produits au passage d'un ion lourd traversant la fenêtre (figure 3.7b page suivante). Afin d'optimiser le ratio du signal sur le bruit et de maximiser l'induction d'électrons secondaires, la membrane en nitrure de silicium est recouverte d'une couche de CsI. Une efficacité de détection de 99,5% a été obtenue dans cette configuration pour les ions carbone (Heiss et al., 2004).

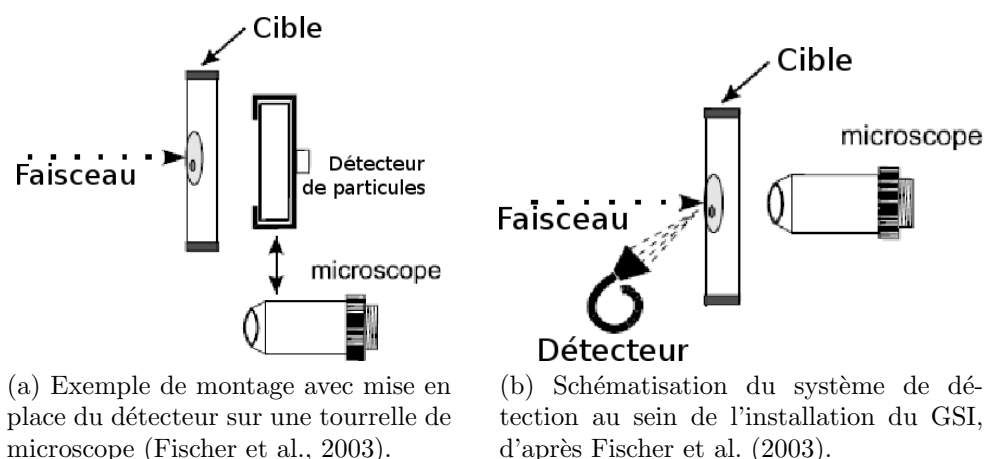


FIGURE 3.7 – Exemples de systèmes de détection.

3.3.6 Maintien d'échantillons biologiques

Les échantillons biologiques requièrent une attention particulière quant à l'environnement dans lequel ils se trouvent. Les cultures de cellules doivent être maintenues dans un environnement humide, à température contrôlée et stérile afin de garantir des conditions de croissance non stressante. Ceci est parfois difficile à mettre en place au sein d'instrumentations élaborées comme les installations d'irradiation par microfaisceaux d'ions.

De plus, les cellules doivent être mises en culture sur un support lui-même convenant à l'installation. En d'autres termes, les supports doivent donc être biocompatibles mais doivent de la même façon être compatibles avec le système de reconnaissance des cellules.

Par exemple, dans le cas de la visualisation des cibles par la fluorescence, le support cellulaire doit être transparent optiquement et non fluorescent pour la visualisation des cellules. Pour ces conditions, le polypropylène est souvent utilisé mais requiert l'utilisation d'un facteur d'attachement des cellules. Les feuilles de mylar sont aussi un bon candidat, mais elles fluorescent aux UV. D'autres matériaux tels que les CR39 ou le nitrure de silicium sont aussi souvent utilisés.

La géométrie des supports de cultures cellulaires sont en général dépendants de la géométrie de l'installation elle-même, selon par exemple que le faisceau soit vertical ou horizontal, mais aussi dépend de l'encombrement spatial. Les conditions pour chaque installation d'irradiation de culture par microfaisceaux sont donc quasiment unique. Les quelques exemples ci-dessous illustrent la diversité des installations.

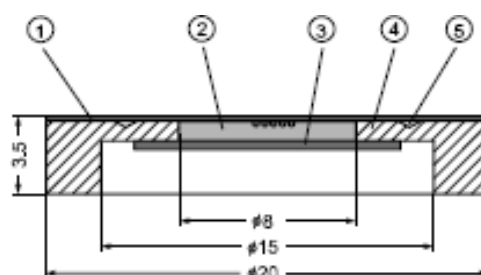
- Dans le cas de l'**université de Colombia** (Randers-Pehrson et al., 2001), le détecteur de particules est placé derrière les cultures cellulaires. Comme l'énergie du faisceau n'est pas suffisamment grande pour parcourir de longues distances, le milieu de culture est aspiré au moment de l'irradiation afin de rétrécir la distance de travail. Une atmosphère contrôlée en CO_2 et en humidité permet de limiter la déshydratation, mais ne conserve

3.3. Conception des installations d'irradiation par microfaisceaux pour la radiobiologie

pas la stérilité. Les support cellulaires sont constitués d'une feuille de polypropylène maintenue dans un puit de 6,3 mm de diamètre.

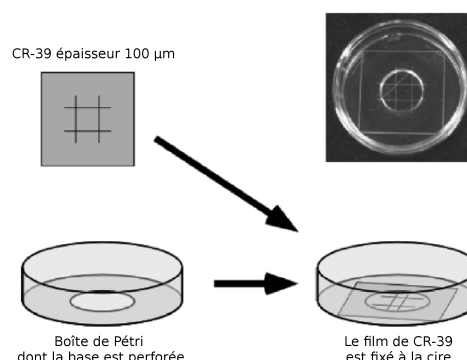
- Au **GCI**, un support annulaire de 34 mm de diamètre peut maintenir une feuille de mylar ou de polypropylène (de 3 à 4 μm d'épaisseur). Cet anneau a été spécifiquement développé pour s'insérer sur la platine de déplacement (Heiss et al., 2004; Folkard et al., 1997b).
- Dans le cas du **PTB** (Greif et al., 2004), les boîtes de cultures ont été élaborées pour directement s'insérer au niveau de la mise à l'air du faisceau. Il s'agit d'une petit chambre cylindrique de 8 mm de diamètre et 1 mm de hauteur, dont la face placée coté faisceau est constituée de téflon de 25 μm d'épaisseur (figure 3.8). Les cellules sont visualisées *via* un microscope inversé et à travers le milieu de culture, épais de 1 mm.

FIGURE 3.8 – Support des cultures cellulaires au PTB. (1) Plan de culture cellulaire, (2) Milieu de culture, (3) Couvercle en verre, (4) Anneau métallique, (5) Sillon.



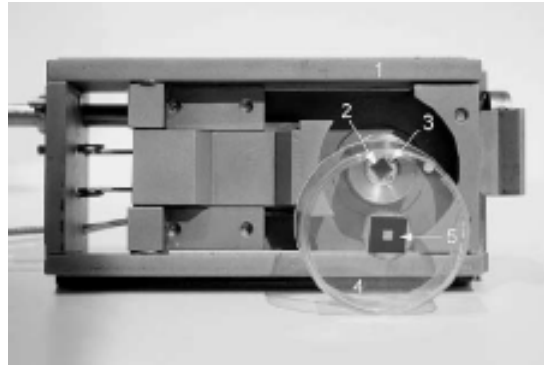
- Au **JAERI**, le socle du support des cultures cellulaires est constitué d'un détecteur CR39 de 100 μm d'épaisseur (figure 3.9). Dans ce cas, le milieu de culture est entièrement retiré au moment de l'irradiation, afin de permettre aux ions lourds, provenant par le dessus, de traverser à la fois les cellules et le détecteur. Les cellules sont recouvertes d'une feuille de kapton de 8 μm d'épaisseur afin de prévenir la déshydratation et la contamination par des microorganismes. Suite à l'irradiation, un milieu de culture chaud est immédiatement ajouté. La révélation du CR39, qui permet de visualiser les impacts des ions, est réalisée dans un bain d'éthanol alcalin à 37°C (Funayama et al., 2008). Cette méthode ne semble pas apporter de biais à la croissance cellulaire.

FIGURE 3.9 – Support des cultures cellulaire au sein de l'installation du JAERI.



- Au **LIPSION**, des petits puits de cultures ont été confectionnés à partir de boîtes de Pétri conventionnelles de 35 mm de diamètre, modifiées pour recevoir en leur centre une fenêtre en nitrure de silicium de 200 nm et de 2 mm de côté (figure 3.10). Comme la ligne de faisceau est horizontale, ces petite boîtes sont maintenue à la verticale durant l’irradiation. Comme le détecteur est placé derrière les cellules, le milieu de culture doit être retiré au moment de l’installation de la boîte (Reinert et al., 2004).

FIGURE 3.10 – Support des cultures cellulaire au sein de l’installation du LIPSION. (1) Support maintenant l’ensemble, (2) Diode permettant de détecter les particules, (3) Lumière pour l’observation des cibles, (4) Boîte de pétri, (5) Fenêtre d’irradiation en nitrure de silicium.



- Pour des conditions d’irradiation comparables aux conditions du LIPSION, le **SNAKE** a développé des boîtes comportant un réservoir, ce qui permet de recueillir le liquide alors que la boîte de culture est maintenue à la verticale. Ceci limite le temps d’absence du milieu de culture (Dollinger et al., 2005).
- Les équipes du **INFN-LNL** (Gerardi et al., 2005, 2004) ont elles aussi développé des supports cellulaires très spécifiques. La boîte de culture est constituée d’acier inoxydable et a un diamètre externe de 100 mm. Cette chambre est équipée pour le maintien de la température et de l’humidité. Le socle et le couvercle de cette chambre sont constitués de mylar d’une épaisseur de 6 μm , ce qui permet de placer un détecteur à l’arrière des cellules. Cette chambre permet le maintien du milieu de culture sur les cellules au cours de l’irradiation alors que la disposition de la boîte est verticale.

Synopsis

Chapitre 3

Concevoir un microfaisceau de particules idéalement dédié à l'irradiation de cellules en culture, requiert différentes exigences. Ces conditions sont toutes liées à l'adaptation de l'installation à la pratique de la biologie pour l'irradiation à de faibles doses et à la reproductibilité des irradiations.

La **verticalité du faisceau** est la première d'entre elles, cette disposition permet de mettre en place de bonnes conditions de cultures cellulaires, sur des supports horizontaux.

Les conditions complémentaires identifiées sont directement reliées aux développements techniques :

- La dimension du faisceau doit être réduite à une grandeur **micrométrique** ou **sub-micrométrique**, conforme aux dimensions cellulaires ou sub-cellulaires.
- Le courant de faisceau doit être réduit afin d'assurer la **numération des particules** arrivant sur l'échantillon avec la haute reproductibilité.
- Un système de **visualisation** et de **localisation** de cellules, basé sur un microscope équipé avec une caméra CCD couplée à un logiciel approprié.
- Un système de **micropositionnement** doit permettre de placer les cellules ciblées dans le faisceau d'ions (ou inversement) avec une haute reproductibilité.
- Un détecteur de particules peut aussi être mis en place pour **compter** le nombre de particules délivrées par cellule avec une haute efficacité. Ce détecteur agit en général comme un bouton d'arrêt sur un déflecteur rapide pour éteindre le microfaisceau quand le nombre programmé de particules par cellule a été livré.

A coté des contraintes techniques, certaines exigences sont quant à elles directement dépendantes de contraintes biologiques.

- Pour travailler avec des cellules **vivantes**, le faisceau doit être **extrait à l'air**.
- Un incubateur *in situ* permettant de maintenir les cellules dans un milieu chaud et humide afin de **garantir des conditions de culture** non stressantes.

Chacun de ces éléments, directement dépendant de l'installation en question, peut être mis en place selon une approche expérimentale différente.

Deuxième partie

Matériels et Méthodes

Méthodologie

« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison. »
Henri Poincaré

CETTE DEUXIÈME PARTIE présente la méthodologie adoptée ainsi que l'ensemble des techniques et procédures mises en place pour la réalisation des travaux.

La méthodologie adoptée au cours de la thèse se découple en deux temps forts ; il s'agissait au préalable des développements techniques liés à l'adaptation de l'installation pour la radiobiologie puis ensuite de la réalisation d'études concernant la réponse cellulaire suite à une irradiation ciblée. La figure 1 page suivante décrit d'une manière schématique la méthodologie adoptée.

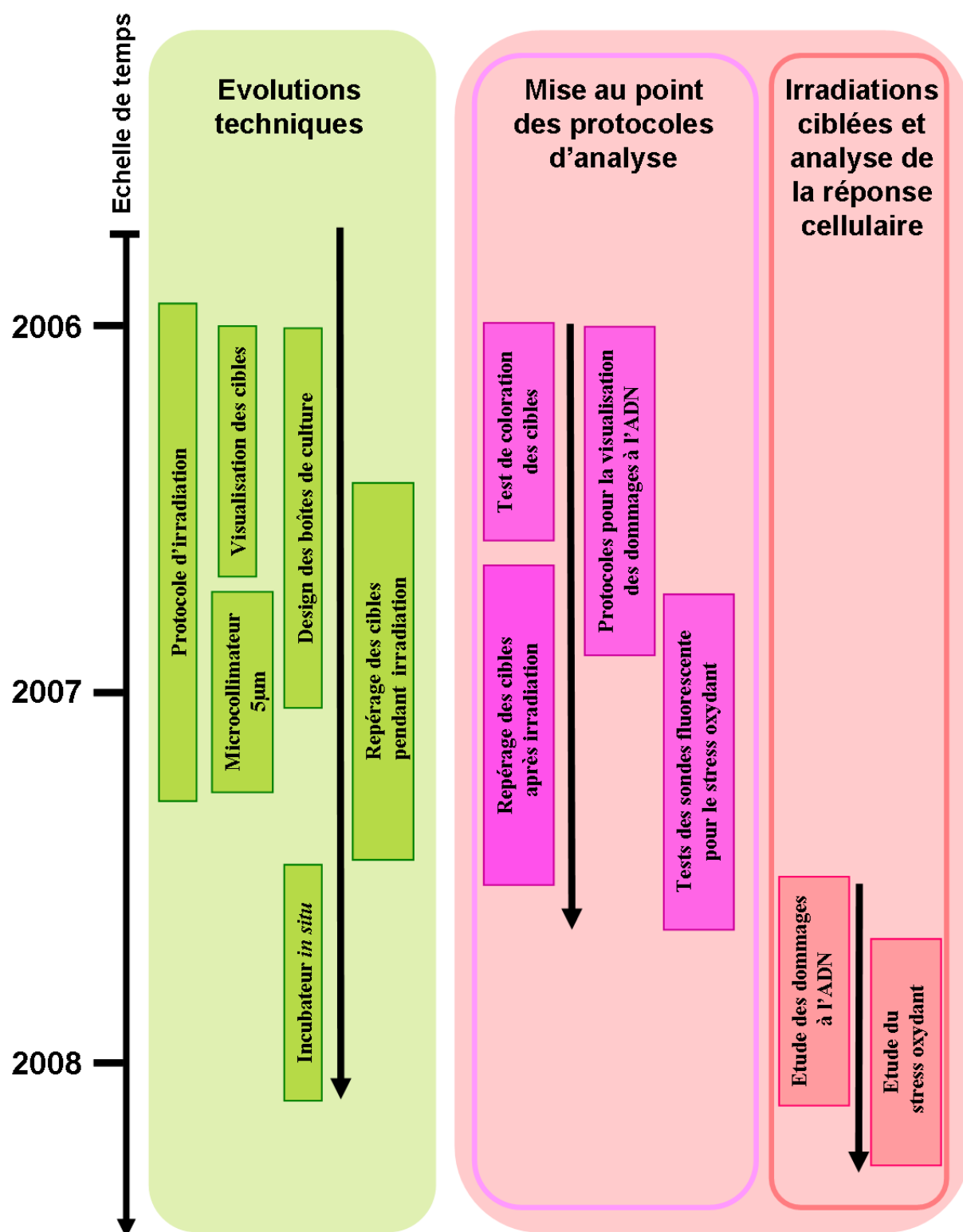


FIGURE 1 – Schématisation de la réalisation des travaux de thèse représentant la méthodologie adoptée.

Principes et procédures

L'OBJECTIF DE CETTE DEUXIÈME PARTIE est de présenter l'ensemble des procédures choisies et mises en place pour la réalisation des travaux. Le principe de chaque technique est tout d'abord présenté, puis les procédures d'utilisation de ces techniques sont ensuite détaillées.

1 Irradiation par microfaisceau d'ions

1.1 La microsonde nucléaire

La microsonde nucléaire du laboratoire Pierre Süe du CEA de Saclay est basée sur un accélérateur linéaire de type KN3750 Van de Graaff (Khodja et al., 2001). L'installation, dédiée initialement à l'analyse élémentaire, est équipée de deux lignes de microfaisceaux horizontales : la voie à 90° pour l'analyse d'échantillons froids et la voie à 45° pour l'analyse des échantillons radioactifs (figure 1 page suivante).

Le principe de fonctionnement d'une microsonde nucléaire s'apparente à celui d'un microscope électronique à balayage et est principalement dédiée à l'analyse de matériaux. Un faisceau d'ions légers de quelques MeV est fortement collimaté puis focalisé jusqu'à une taille de l'ordre de quelques micromètres sur la cible. Des plaques de déflexion électrostatique situées à la sortie du système de focalisation permettent un balayage bidimensionnel du faisceau dans le plan de la cible donnant ainsi accès à une cartographie 2D de l'échantillon à analyser. On trouvera une description détaillée de la microsonde du laboratoire Pierre Süe à la référence Berger and Revel (2005).

Le faisceau d'ions est délivré par un accélérateur électrostatique de type Van de Graaff 3,75 MV (figure 2 page 77). Ce type d'accélérateur présente un double intérêt pour l'obtention de microfaisceaux focalisés. Tout d'abord, il est équipé d'une source radio fréquence très brillante donnant accès à des flux de particules élevés, même après collimation. Ce type d'accélérateur permet d'obtenir des faisceaux très stables en énergie et en position, ce qui est une condition indispensable à l'obtention d'une bonne résolution spatiale sur cible. Le faisceau délivré en sortie d'accélérateur est guidé vers un aimant d'analyse par une série de lèvres et de déflecteurs électromagnétiques. Lors du passage dans l'aimant, seuls les ions ayant le rapport masse/charge souhaité seront défléchis de manière à pénétrer dans la ligne de faisceau (figure 2 page 77). La position du faisceau en sortie d'aimant est

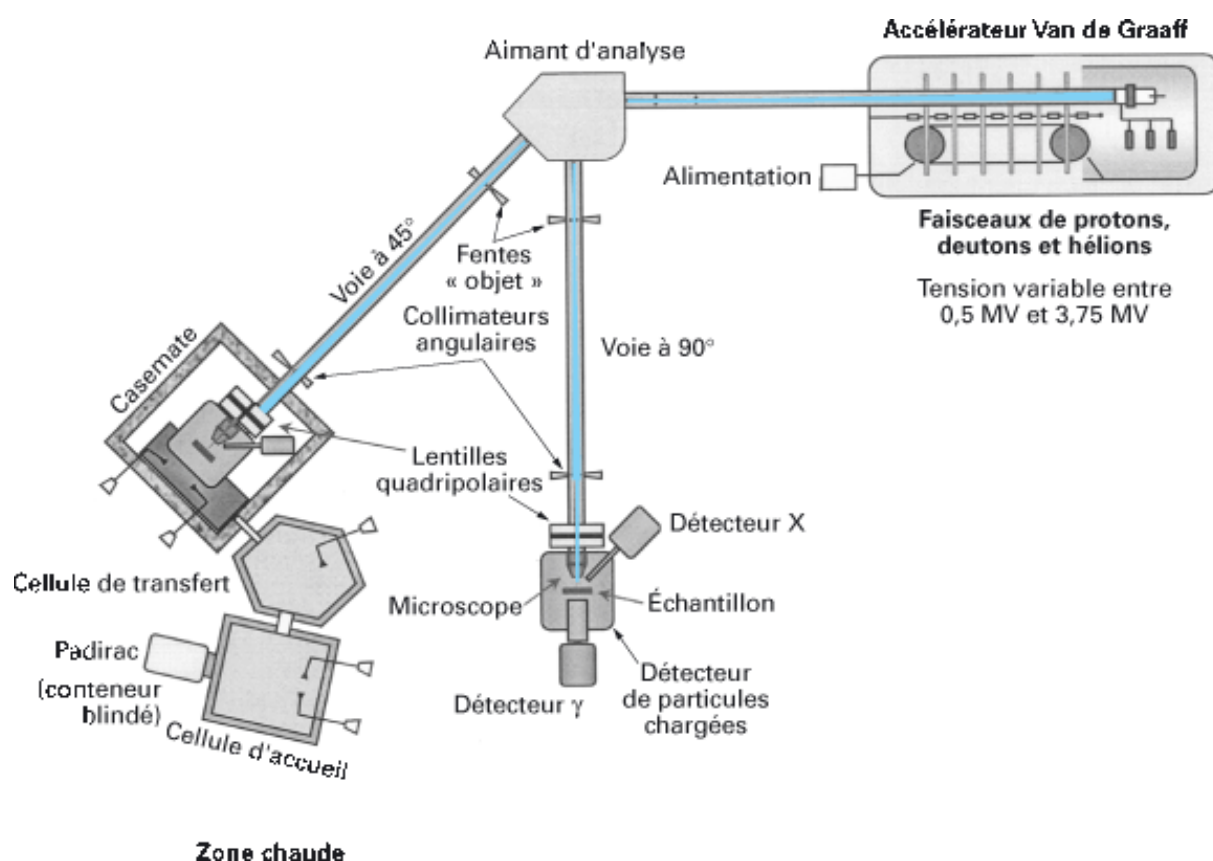


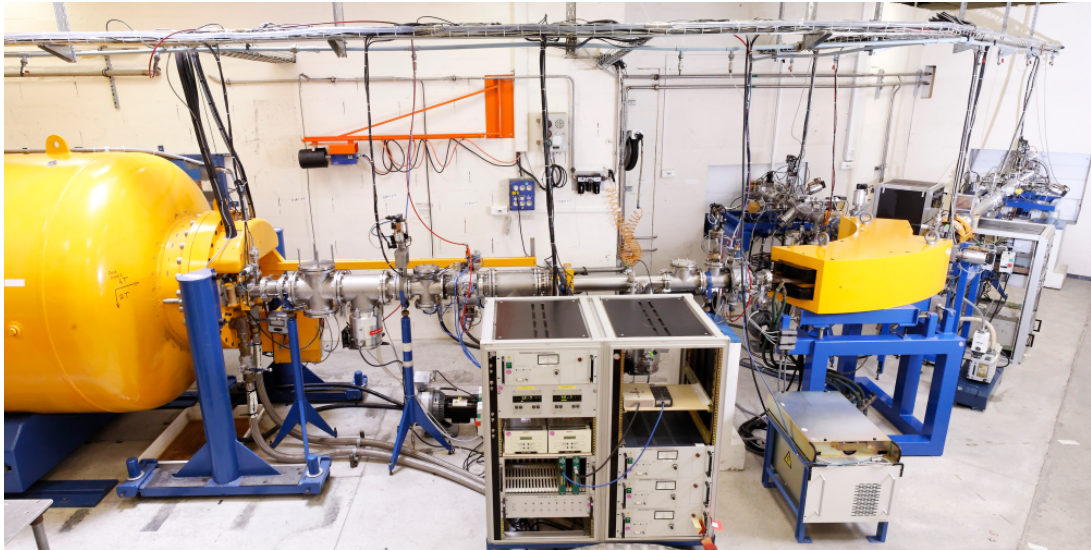
FIGURE 1 – Présentation de la microsonde nucléaire et des lignes de faisceaux.

asservie grâce à des lèvres de régulation permettant une rétroaction au niveau du potentiel accélérateur. Après être passées entre les lèvres de régulation, les particules entrent dans une des lignes. Les techniques d'analyse et de caractérisation pour l'analyse élémentaire sont décrites en annexe B page 167.

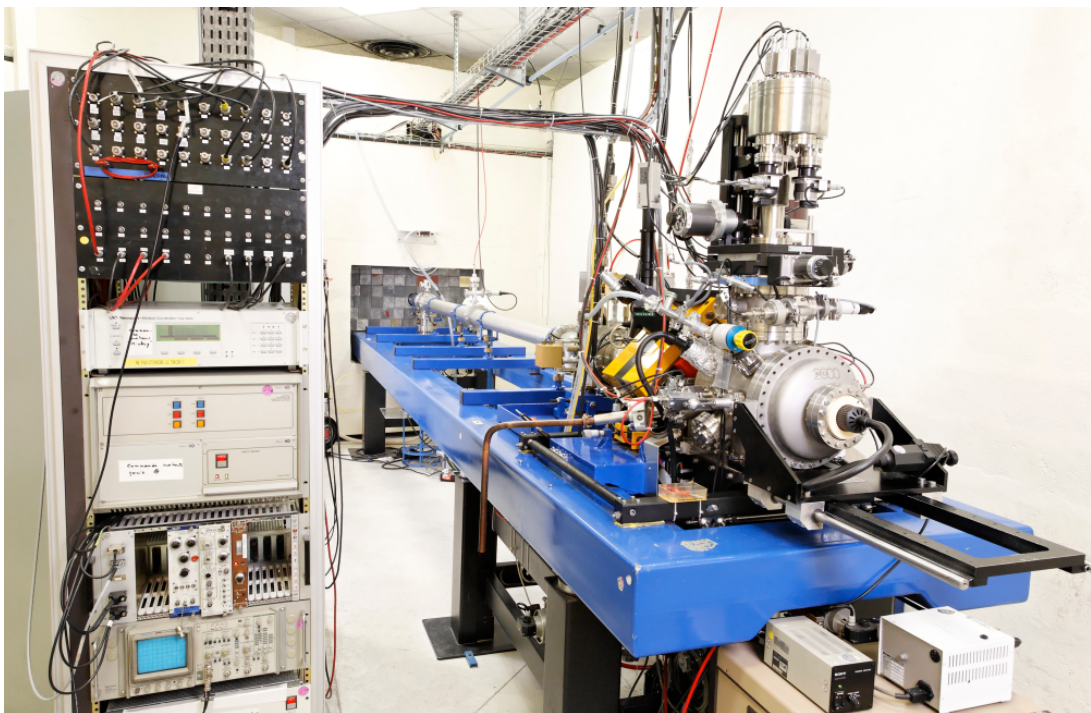
1.2 État de l'installation au début du projet de thèse

Le laboratoire Pierre Süe entrepris le développement d'une plateforme d'irradiation pour la radiobiologie en 2004. Fort des connaissances apportées par la littérature pour le développement de telles plateformes (voir chapitre 3 page 51) et des compétences de l'équipe travaillant autour de la microsonde nucléaire, une troisième ligne est mise en place à partir de la voie à 45° *via* l'implantation d'un électro-aimant fin 2004. Ceci permet de défléchir le faisceau à la verticale (figure 3a page 78) et désigne l'emplacement de la plateforme d'irradiation pour la radiobiologie.

En 2005, l'extraction du faisceau est réalisée *via* l'utilisation d'une membrane en nitrure de silicium de 500 μm de côté. La formation du microfaisceau est obtenue par collimation. Le premier collimateur mis en place était constitué de silice et avait un diamètre interne de 30 μm (?). Ce collimateur a été changé en décembre 2006 afin de réduire la taille du faisceau. Le nouveau collimateur encore en place actuellement est constitué de silice. Il a



(a) Accélérateur (à gauche) et aimant d'analyse (à droite) se poursuivant par les lignes de faisceaux (voie à 45 et 90°).



(b) Chambre d'analyse des échantillons non irradiant.

FIGURE 2 – Microsonde nucléaire du laboratoire Pierre Süe (Crédit F. Vrignaud/CEA).

un diamètre interne de 6 μm .

La disposition du faisceau permet une irradiation par le dessous. Un microscope à épi-illumination de type BXFM Olympus est alors monté sur une table anti-vibration afin de permettre une observation par le dessus, en absence de lumière transmise (figure 3b).

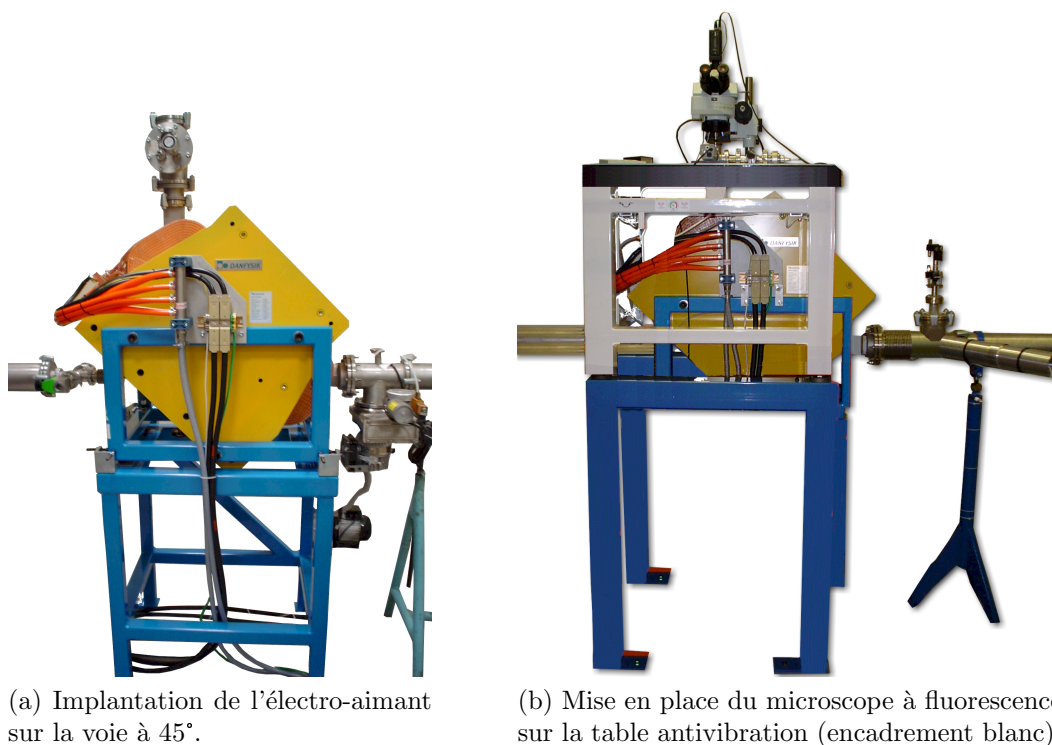


FIGURE 3 – Mise en place de l'électroaimant et du microscope à fluorescence.

1.3 Protocole d'irradiation

Préparation de l'installation

La plateforme d'irradiation est englobée dans un incubateur permettant le maintien d'une température constante à 37°C compatible avec la culture cellulaire. L'incubateur est allumé 24 heures avant irradiation. La chambre micro-environnementale entretient une atmosphère contrôlée en gaz (mélange air et 5% de CO_2) en en humidité. Elle est mise en fonctionnement une heure avant l'irradiation de culture. Ainsi, la procédure d'étalonnage et d'irradiation sont réalisées dans les mêmes conditions de température et d'humidité.

Le dispositif d'étalonnage

Un dispositif de **repérage en position du faisceau extrait** à l'air a été mis au point.

Une feuille de BC400 peut être positionnée à la place du puits de culture. L'impact du faisceau sur le BC400 créant des photons, une observation au microscope sans

lumière permet de visualiser l'emplacement du faisceau. Cette position est déterminée *via* l'option de reconnaissance de forme du logiciel Imag Pro Plus couplé au calcul de la position du barycentre de la forme identifiée.

Afin de réaliser la phase d'étalonnage du système d'irradiation, une **diode PIN** utilisée comme détecteur de particules vient se positionner à la place du puits de culture. Le détecteur PIN peut détecter les particules en transmission à travers le collimateur.

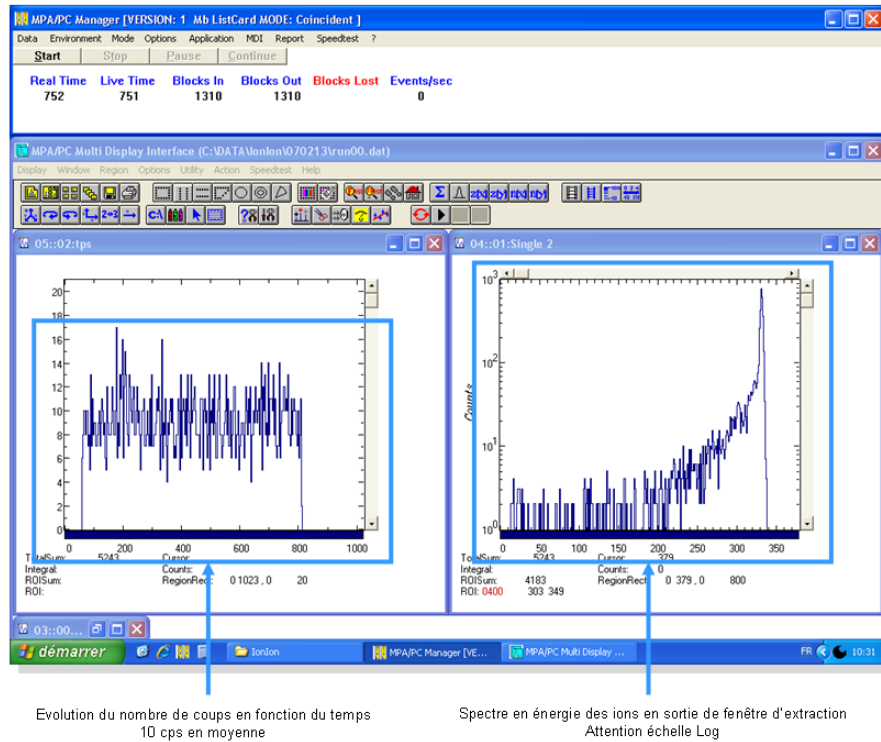


FIGURE 4 – Étalonnage du système d'irradiation. Mesure du flux de particules (à gauche) et de l'énergie des particules (à droite).

Le faisceau incident est à trois MeV (table de droite dans la figure). La fluence du faisceau est déterminée de façon à obtenir en moyenne 10 particules α par seconde.

Déplacements de la cible

Le positionnement d'un grand nombre de cellules (entre 400 et 500 par puits de culture) en face du point de sortie du faisceau a nécessité l'automatisation du système de déplacement mécanique. L'étage supportant l'échantillon a été motorisé. Les platines de déplacements micrométriques utilisées sont des platines de translation entraînées par un moteur à courant continu intégré (Marzhauser). Le guidage du mouvement est assuré par un double chemin de billes. Ces platines, qui ont une course maximum de 25 mm, sont entraînées par une vis d'un pas de 0.5 mm. Un codeur optique à 48 points/tour, placé sur l'axe du moteur à courant continu, permet une lecture de position. La résolution du mouvement, c'est-à-dire le plus petit mouvement théorique possible d'effectuer avec ce système, est liée à la résolution du codeur optique qui est ici de 0.05 μm . Ces platines motorisées ont été

assemblées afin de constituer un étage de déplacement permettant de positionner l'échantillon suivant les deux axes XY. Un troisième axe Z parallèle à l'axe du faisceau permet de déplacer la platine manuellement.

1.4 Dispositif d'observation

Le dispositif d'observation doit permettre l'observation puis le repérage des cellules pour l'irradiation par microfaisceau.

Le microscope Olympus pour l'observation des cellules

La plateforme d'irradiation est surplombée par un microscope droit à fluorescence de type BXFM Olympus. La source de lumière utilisée sur l'étage d'irradiation est une lampe à mercure de type Olympus U-ULH. Cette source possède de nombreuses raies d'émission dans le domaine ultraviolet. L'objectif le plus couramment utilisé est un objectif Olympus de type UPlanFI 5x adapté à la microscopie de fluorescence. Un objectif de type IM-PlanFI 20x est également adaptable pour l'analyse après irradiation. Le microscope est équipé de deux filtres de lumière. Le filtre d'excitation de type U-MWIB2 à bande large, permet de limiter l'excitation entre 460-490 nm. Le filtre d'excitation de type U-MWU2 à bande large, permet de limiter l'excitation au proche ultraviolet entre 330-385 nm. L'ensemble du microscope est supporté par une platine de déplacement micrométrique lui permettant de se déplacer dans un plan vertical parallèle à l'axe du faisceau. La mise au point se fait à l'aide d'un vérin motorisé (Newport. 850G). Ce système motorisé permet notamment de faire la mise au point sur les échantillons sans avoir à toucher l'étage d'irradiation afin de ne pas le déplacer par rapport au faisceau.

L'acquisition d'image

L'acquisition d'images numériques se fait à l'aide d'une caméra CCD haute résolution CoolSnap ES fournie par Photometrics. Le capteur CCD est de type Kodak KAF-0400 CCD, 1315x1033 pixels, refroidi à -12°C par effet Peltier.

1.5 Visualisation de l'impact des ions alpha à l'aide de détecteur plastique CR39

Le plastique CR39 permet le repérage des impacts de particules afin de déterminer la précision de ciblage de l'installation d'irradiation.

Principe

Le CR 39 est un polymère de formule $(C_{12}H_{18}O_7)_n$ présentant $2n$ groupes fonctionnels allyles. Le CR 39 se classe parmi les détecteurs solides de traces. Il s'agit d'un plastique couramment utilisé en physique nucléaire pour détecter, identifier et compter des particules. Il se présente sous la forme de petites feuilles de quelques cm de côté et de quelques dixièmes de mm d'épaisseur (classiquement 0,7 mm et 1,4 mm). Le CR 39 est bon marché,

beaucoup moins coûteux que les dispositifs de spectrométrie habituels. Son usage est relativement rapide. Il s'agit bien entendu d'une détection à posteriori que l'on classe dans les dosimètres passifs (comme les films radiographiques).

Lors du passage des particules chargées dans le CR 39 celles-ci déposent de l'énergie dans le plastique et cassent des liaisons polymères. Le long de leur parcours ces particules modifient les propriétés du CR 39 (les régions endommagées deviennent chimiquement sensibles). Ces modifications induites se traduisent par une vitesse d'attaque chimique plus importante le long de la trace formée qu'à l'extérieur. Dans chaque plan du plastique on observe donc des trous dont le diamètre dépend de la charge Z et de l'énergie de la particule.

Attaque chimique

Pour rendre ces traces exploitables, les feuilles de CR 39 sont traitées selon un procédé de gravure électrochimique. Les conditions de développement, comme la concentration et la température de la solution, la durée de trempage influent sur la taille des trous. Les plaques que nous avons utilisées ont été plongées dans une solution de NaOH 6 M pendant 2 h, au bain-marie à 80°C. Le traitement chimique des feuilles est indispensable pour révéler les traces laissées par les particules chargées dans le CR 39 et les analyser. Après ce procédé de gravure, les plaques sont rincées à l'eau distillée et séchées. Le nombre de traces est mesuré à l'aide d'un microscope optique.

2 Biologie cellulaire

Cette section décrit la lignée cellulaire utilisée ainsi que le protocole de maintien des cultures cellulaires et les traitements chimiques utilisés.

Description de la lignée MC3T3-E1

Les cellules MC3T3-E1¹, cellules primaires pré-ostéoblastiques (Kartsogiannis and Ng, 2004), sont issues de la calvaria d'un nouveau né de souris, d'où leur nom. Le sous clone 4 a été sélectionné pour sa grande capacité à se différencier en ostéoblaste mature dans un milieu de culture contenant de l'acide ascorbique (Wang et al., 1999). En effet, dans ce cas les cultures montrent l'expression de marqueurs ostéoblastiques tels que la sialoprotéine osseuse, l'ostéocalcine et l'hormone parathyroïde ainsi que les récepteurs protéiques associés. La production de collagène ainsi que l'expression des ARNm codants pour l'Osf2/Cbfa1, facteur de transcription caractéristique des ostéoblastes sont aussi retrouvés. c'est pourquoi cette lignée cellulaire est largement utilisée pour les études *in vitro* de la différenciation ostéoblastique. Le choix de cette lignée, dans le cadre d'irradiation par microfaisceau d'ions, est basé sur sa radiosensibilité. Il s'agit en effet de l'une des rares lignées ostéoblastiques normale référencée comme l'une des plus radiosensibles (Deschavanne and Fertil, 1996; Lau, 2005). Ce type cellulaire présentent entre autres de nombreux avantages pour l'étude de l'effet de voisinage : il possède des communications de type gap

1. Mouse Calvaria 3 To 3, à trypsiner tous les 3 jours

riches en Cx 43 et la possibilité de communiquer par sécrétion de facteur soluble dans le milieu (Donahue et al., 1995; Schiller et al., 2001).

Maintien des cultures cellulaires

Les MC3T3 ont été fournies par l'ATCC¹ et leur milieu de culture spécifique par Sigma-Aldrich². Ce milieu, contenant par défaut de l'acide ascorbique, est de plus complétement avec 10% de sérum de veau foetal, 2 mM de L-glutamine et 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamycine sulfate. Les cultures sont maintenues à 37°C, en atmosphère humide contrôlée à 5% de CO_2 .

Les cellules MC3T3 ont été décongelées après réception etensemencées à une densité de 3500 cellules/ cm^2 . Après amplification, des stocks de cellules au passage 5 et 6 ont été congelés. Toutes les expériences ont ensuite été réalisées à partir de ces stocks, les expositions aux rayonnements ayant ainsi été systématiquement effectuées sur des cellules à passage 7 ou 8. Les cellules ont toujours étéensemencées à 3500 cellules/ cm^2 et repiquées lorsqu'elles arrivaient à pré-confluence (environ 80% de confluence). Les repiquages ont été effectués à l'aide d'une solution de trypsine 0,05%-EDTA.

Pour l'irradiation par microfaisceau d'ions, les cellules MC3T3 sontensemencées sur la fenêtre d'irradiation uniquement. Pour cela, les boîtes sont préalablement stérilisées par des bains dans l'alcool à 70%. Un cylindre de clonage est utilisé afin de retenir le liquide à cette position (figure 1.4 page 102). Les cultures sontensemencées 24 heures avant l'irradiation, pour cela, un facteur d'adhésion (Poly-L-lysine, P4832, Sigma-Aldrich)) est dans un premier temps déposé sur le puits de culture pendant 30 min, puis 10000 cellules sont diluées dans 400 μL de milieu puis placées dans le cylindre de clonage.

Traitements chimiques

L'étoposide est un agent se complexant avec la topoisomérase II de l'ADN, ce qui a comme conséquence d'augmenter la propension des cassures double et simple brin, ainsi qu'inhiber la religation de l'ADN. Il est utilisé comme un mimétique chimique des rayonnements ionisants et permet donc d'en tester les conséquences sur un grand nombre de cellules. Dans ce but, lors du test des micronoyaux (présenté en section 4 page ci-contre), les cultures sont exposées 24 heures à l'étoposide 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (référence : E1383, Sigma-Aldrich).

La filipine est un agent chimique dissociant les radeaux lipidiques. Il est utilisé afin d'étudier l'implication des signaux issus de la membrane dans la réponse cellulaire à l'irradiation. Les cultures sont incubées 15 minutes avant irradiation à la filipine 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (référence : F4767, Sigma-Aldrich).

1. American Type Culture Collection, référence CRL-2593.

2. Milieu alpha-MEM, référence M8042.

3 Évaluation de la viabilité cellulaire

La cytotoxicité et la croissance cellulaire après exposition ont été déterminées par un test de cytotoxicité classique, le MTT. Pour cela, un kit commercial (Sigma, St Quentin Fallavier, France) a été utilisé suivant les indications du fournisseur.

Principe du test

Ce test consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes par dosage colorimétrique. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT (ou bromure de 3[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium), de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus. Cette conversion se produit uniquement dans les cellules vivantes. Les cristaux de formazan sont ensuite solubilisés et la solution colorée résultante est quantifiée au spectrophotomètre par mesure de l'absorbance (Abs) à 565 nm. Un puits « blanc », c'est-à-dire sans cellules, permet de définir le bruit de fond du test. La quantité de formazan formée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Protocole d'évaluation de la cytotoxicité

Les cellules ont été cultivées et exposées en microplaques de 96 puits (6 puits par condition). Au terme de l'exposition, 10 μL de solution de MTT à 5 g.L^{-1} dans du PBS ont été déposés dans chaque puits. Les microplaques ont ensuite été incubées 1 h à 37°C à l'abri de la lumière. Au terme de la période d'incubation, les surnageants ont été éliminés et les cristaux de formazan formés au sein des cellules ont été solubilisés dans 100 μL de solubilisateur (10% de TRITON X100 dans de l'isopropanol contenant 0,1 N d'acide chlorhydrique HCl). Les solutions colorées ont ensuite été homogénéisées par agitation et leurs absorbances à 565 nm ont été mesurées au spectrophotomètre SpectraMax M2 (Molecular Devices, St Grégoire, FRANCE). La cytotoxicité obtenue dans la condition X (Cx) a été définie en rapportant l'absorbance mesurée dans cette condition (Ax) à celle mesurée dans les contrôles, c'est-à-dire dans les cellules non exposées (Ac) selon la formule suivante :

$$Cx(\%) = (Ac - Ax)/Ac.$$

Cette cytotoxicité a ainsi été déterminée pour la majorité des conditions de concentrations et de temps d'exposition de chaque traitement appliquées aux cultures cellulaires. Les IC50 de la majorité des produits chimiques employés ont ainsi été déterminées.

4 Le test des micronoyaux

Le test des MN par blocage de la cytokinèse est un test de référence pour l'étude de la génotoxicité.

Principe

Les micronoyaux sont définis comme étant de petits corps extranucléaires se formant au cours de la mitose. Ils contiennent soit un fragment de chromosome, soit un chromosome

tout entier. Les micronoyaux recelant un fragment de chromosome résultent de (a) la cassure directe de la molécule d'ADN, (b) la réplication à partir d'un brin d'ADN parental endommagé, (c) une inhibition de la synthèse de l'ADN. Les micronoyaux recelant un chromosome entier sont quant à eux formés principalement à partir d'un échec au cours de la mitose de la formation d'une partie de l'appareil mitotique (kinétochores, spindle...) ou d'une disruption mécanique.

C'est pourquoi, l'augmentation de la fréquence d'apparition des micronoyaux (MN) est un biomarqueur de génotoxicité (Albertini et al., 2000).

Procédure

Le protocole mis en place est basé sur la technique de blocage de la cytokinèse établie par Fenech (Fenech, 2000) dans lequel la numération des MN se limite aux cellules s'étant divisées une fois depuis le traitement chimique ou radiologique.

Le témoin positif de création de MN est l'étoposide.

Après traitement avec un agent génotoxique ou après irradiation, les cultures sont lavées deux fois avec du milieu culture préchauffé à 37°C contenant de la cytochalasine B (2,5 µg/ml final), puis sont mises à incuber pour 24 h à 37°C dans ce même milieu.

La cytochalasine B est une toxine fongique, perméable pour les cellules, qui a comme conséquence de rompre les microfilaments contractiles par inhibition de la polymérisation de l'actine. La division cellulaire est donc inhibée.

Après 24 h d'incubation, les cultures sont lavées avec un mélange méthanol/acétate en proportion 9 :1 (v :v) puis fixées par incubation avec ce même mélange pendant 20 min à température ambiante. Les cultures sont ensuite séchées à l'air (sous hotte), puis colorées successivement à l'acridine orange (10 µg/ml) puis au Hoechst 33342 (5 µg/ml) pendant 5 minutes.

La numération des micronoyaux

Les cultures sont observées par microscopie de fluorescence au grossissement 200 x. L'acridine orange est visualisée par excitation à 500 nm et émet à 530 nm, elle permet de visualiser le cytoplasme des cellules. Le Hoechst est excité à 355 nm et émet à 465 nm, il colore l'ADN et permet donc de voir les noyaux et les micronoyaux.

La numération des micronoyaux est basée sur des critères uniformes précédemment exposés dans la littérature (Ballarin et al., 1992; Fenech, 1993; Garewal et al., 1993). Ces critères sont principalement morphologiques. En effet, le diamètre des MN ne doit pas excéder 1/3 de la taille du noyau principal (appelé macronoyau). Le MN doit être clairement séparé du macronoyau et présenter des bords distincts.

Seuls les MN présents dans des cellules binucléées doivent être pris en compte. La numération de ce nombre de MN rapportée au nombre de cellules binucléées correspond à l'indice Y_{MN} .

5 Immunodétection de dommages à l'ADN

L'immunodétection de γ H2AX et 53BP1 est une technique de référence pour la détection des cassures double brin de l'ADN (Rothkamm and Lobrich, 2003).

Principe de l'immunodétection indirecte par fluorescence

L'immunodétection indirecte fait intervenir deux anticorps (figure 5) :

1. L'anticorps primaire, désigné pour reconnaître de façon spécifique un antigène (portion de protéine d'intérêt, molécule possédant des caractères de charges spécifiques. . .).
2. L'anticorps secondaire, conjugué à un fluorochrome, est désigné pour reconnaître spécifiquement un fragment de chaîne de l'anticorps primaire. Il permet par microscopie de fluorescence la localisation de l'antigène.

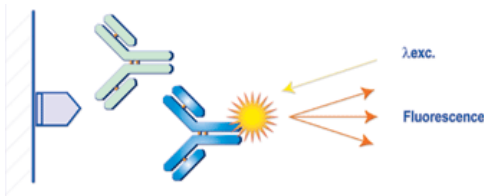


FIGURE 5 – Principe de l'immunofluorescence indirecte.

Le protocole utilisé pour la détection des dommages à l'ADN est une co-immunodétection ; il s'agit de deux immunodétections simultanées. L'objectif est de co-localiser deux protéines différentes dans les cultures cellulaires : γ H2AX et 53BP1.

Protocole

Les cultures sont fixées pendant 20 minutes dans une solution de paraformaldéhyde à 4% puis perméabilisées pendant 10 minutes par une solution à 0,2% de Triton X-100. A cette étape, les cultures peuvent être conservées sur la nuit à 4°C dans du PBS.

Préalablement à l'incubation des anticorps, les cultures sont baignées dans une solution de PBS complémenté avec 3% de lait écrémé en poudre (20 minutes) afin de bloquer les sites potentiels de liaisons aspécifiques. Puis les anticorps primaires sont incubés dans cette même solution à température ambiante pendant 90 minutes à raison de la dilution suivante : anticorps monoclonal IgG de souris anti- γ H2AX (Ser-139), 1 :1000 (Upstate Biotechnology) et anticorps polyclonal IgG de lapin anti-53BP1 (H-300) , 1 :300 (Santa Cruz Biotechnology).

Les anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de souris et anti-IgG de lapin marqués respectivement au FITC (Sigma) et au Texas Red (Santa Cruz Biotechnology) sont quant à eux incubés à une dilution de 1 :1000 pendant 60 minutes. Les cultures sont ensuite montées sur lame de microscope avec du gel de maintien (Glycergel, Dako). L'acquisition d'image pour la visualisation des foyers de γ H2AX et 53BP1 est réalisée à température ambiante avec un microscope de type Zeiss Imager M1 équipé d'un objectif 40x plan-neofluar à huile et d'une caméra Zeiss AxioCam sous contrôle du logiciel Axiovision 4.2.

Les images utilisées pour la comparaison entre différents traitements ont été acquises avec les mêmes paramètres d'instruments et de temps d'exposition sur un microscope M1 Imager Zeiss au grossissement 400x. La superposition des foyers 53BP1 et γ H2AX est compatible dans chaque noyau cellulaire des cellules ciblées et *bystander*. L'identification des foyers superposés est réalisée *via* ImageJ, logiciel libre d'analyse d'image proposant un plugin de colocalisation (*plugin/colocalization*). Les foyers superposés déterminés par cette option sont dénombrés manuellement, noyau par noyau.

6 Analyse du métabolisme oxydatif

Afin d'étudier la génération d'espèces réactives de l'oxygène après irradiation, trois sondes fluorescentes nommées CM-H2DCFDA, DHR123 et CMAC, permettant la détection directe d'espèces radicalaires ou de l'activité antioxydante ont été utilisées. Chacune est présentée ci-dessous.

6.1 CM-H2DCFDA

La sonde 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA) est utilisée pour la détection d'une large gamme de radicaux : H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$, le radical perhydroxyle $\text{HO}_2\cdot$, le radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$, le radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, les dérivés alkoxy ($\text{RO}\cdot$) et le peroxyne (ONOO^-) (Bonini et al., 2006; LeBel et al., 1992).

Principe

CM-H2DCFDA traverse la membrane plasmique passivement. Une fois dans la cellule et sous l'action des estérases intracellulaires, le groupement acétate. CM-H2DCF est alors bloquée à l'intérieur de la cellule. La sonde devient fluorescente suite à son oxydation par des EROs.

Protocole

Les cultures sont lavées deux fois dans une solution de PBS chaud (Sigma Aldrich) afin d'éliminer toute trace de milieu. La solution de coloration au CM-H2DCFDA est réalisée extemporanément. Un aliquot de 50 μg de CM-H2DCFDA en poudre (C6827, Invitrogen, Molecular Probes) est dilué dans 100 μL de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma) puis dans du PBS chaud à une concentration finale de 3,5 μM . Les cultures sont incubées 20 minutes dans 2 mL de cette solution, dans le noir et à 37°C. Passé ce temps, les cellules sont lavées deux fois avec du milieu de culture préchauffé pour retirer la sonde non incorporée. Elles sont incubées 10 minutes supplémentaires dans du milieu de culture avant observation. Pour l'observation par microscopie de fluorescence (grossissement 50x), les cultures sont placées dans du PBS chaud.

Mesure de la fluorescence

Acquisition d'image. Du fait de sa photo-sensibilité et de son instabilité chimique, une procédure particulière a été élaborée. Les cultures sont placées sur la platine d'observation du microscope BXFM Olympus équipé d'un objectif UMPlanFI 5 x. La mise au point pour l'observation a été préalablement établie avec une culture *test* afin d'éviter toute illumination de l'échantillon à étudier. Une première acquisition d'image est réalisée avec un temps de 150 ms (image 1). Une deuxième capture est réalisée après illumination des cellules à la longueur d'onde d'excitation de la sonde pendant 15 secondes (image 2). Cette illumination prolongée permet de photo-oxyder le CM-H2DCFDA incorporé dans les cellules, le taux de fluorescence mesuré correspond donc au taux total de sonde oxydable dans les cellules. Une troisième acquisition (image3) est ensuite réalisée avec le filtre pour l'observation des noyaux colorés au Hoechst (coloration de repérage avant l'irradiation).

Traitement des images sous imageJ. Le traitement d'image est réalisé en trois temps :

1. Il s'agit dans un premier temps de déterminer la zone de mesure de la fluorescence. Pour une analyse cellule à cellule, le Hoechst est utilisé comme marqueur de référence. Une segmentation de l'image 3 permet d'abord d'isoler les noyaux par rapport au bruit de fond. L'image seuillée est ensuite binarisée (*Process/Binary/Make Binary*), les objets *noyaux* sont individualisés du reste de l'image. Sur ces images binaires est effectuée l'identification des cellules *cibles* et *bystander* par repérage visuel de la mosaïque des noyaux. Les noyaux sont ensuite analysés (selon leur taille et leur circularité) puis les régions d'intérêts (ROI, region of interest) enregistrées. Pour cela, une macro a été réalisée (Macro N°1 en annexe C page 169).
2. Le rapport entre l'image 1 et 2 est réalisé (*Process/Image/Calculator/Subtract*). L'image résultante (image 4) est utilisée pour les mesures de fluorescence, elle représente le taux de sonde oxydée par les EROs par rapport au taux total de sonde oxydable incorporées dans les cellules.
3. La gestion des ROI par le *ROI Manager (Analyse/Tools)* permet de transposer les ROI représentant les noyaux sur l'image 4. L'option *mesure* du *ROI Manager* permet d'effectuer automatiquement la mesure de la fluorescence noyau par noyau, c'est-à-dire mesure la moyenne des niveaux de gris des pixels constituant chaque ROI.

Pour chaque échantillon, la moyenne de fluorescence est mesurée pour la population ciblée et pour la population *bystander*. La valeur obtenue correspond donc au taux moyen de sonde oxydée par les EROs pour une cellule d'une population donnée.

6.2 CMAC

La sonde CMAC (7-amino-4-chloromethylcoumarin, C2110, Invitrogen, Molecular Probes) diffuse passivement à travers la membrane plasmique. Dans la cellule, sa fonction thiol

réagit avec d'autres thiols intracellulaires tel que le glutathion réduit (GSH). Elle permet donc d'évaluer le taux de glutathion réduite intracellulaire.

Test de spécificité et protocole

Afin de tester la spécificité de la sonde CMAC, les cultures sont incubées pendant 24 heures dans du buthionine sulfoximine (BSO), un inhibiteur de la biosynthèse du GSH. Les cultures sont lavées deux fois au milieu de culture chaud (37°C) puis incubées 20 minutes à 37°C dans du milieu de culture préchauffé contenant la sonde CMAC à différentes concentrations (0, 10, 25, 50 et 100 μM). Les cultures sont lavées 2 fois au PBS puis une troisième fois dans une solution de PBS contenant 3% de glutaraldéhyde. Les cultures sont ensuite fixées dans une solution de tampon cacodylate à 0,13 M et 2% de glutaraldéhyde à pH 7,4 à température ambiante pendant 15 minutes, suivie d'une seconde incubation de 45 minutes. Les cultures sont ensuite colorées avec l'iodure de propidium (5 μM) pendant 10 minutes, puis posées sur lame pour observation au microscope. L'IP s'intercale dans l'ADN et les ARN, la coloration permet donc de visualiser l'ensemble de la cellule. Les cultures non traitées sont comparées aux cultures déplétées en glutathion (6 page suivante). Les cultures incubées en présence de BSO, et donc déplétées en glutathion, montrent une fluorescence CMAC faible, le taux de fluorescence est diminué d'environ 60% par rapport aux contrôles avec des concentrations de CMAC de 20, 50 et 100 μM . CMAC est donc spécifique pour la détection du glutathion réduit. Les écarts types sont néanmoins meilleurs dans le cas d'une coloration avec 100 μM de sonde. C'est pourquoi lors des tests d'irradiation, ce protocole est appliqué avec une concentration CMAC de 100 μM .

Mesure de la fluorescence

L'acquisition d'images est réalisée par microscopie (microscope Zeiss imager M1) équipé d'un objectif à huile 40 x. Pour une analyse cellule à cellule, la coloration à l'iodure de propidium (IP) est utilisée en colorant de référence. L'image de la coloration IP est donc seuillée puis binarisée afin de définir chaque ROI (utilisation de la macro N°1 en annexe C page 169). La mesure de la fluorescence dans ces ROI est ensuite effectuée automatiquement par transposition des ROI sur les images originelles de la sonde CMAC (Macro N°2 en annexe C page 169).

6.3 DHR123

La dihydrorhodamine 123 (DHR 123) est utilisée pour la détection de radicaux mitochondriaux.

Principe

DHR 123 est une molécule non chargée, traversant la membrane plasmique passivement pour se localiser dans les mitochondries. Une fois à l'intérieur des mitochondries, les EROs peuvent oxyder la sonde, qui devient alors la rhodamine 123, fluorescente.

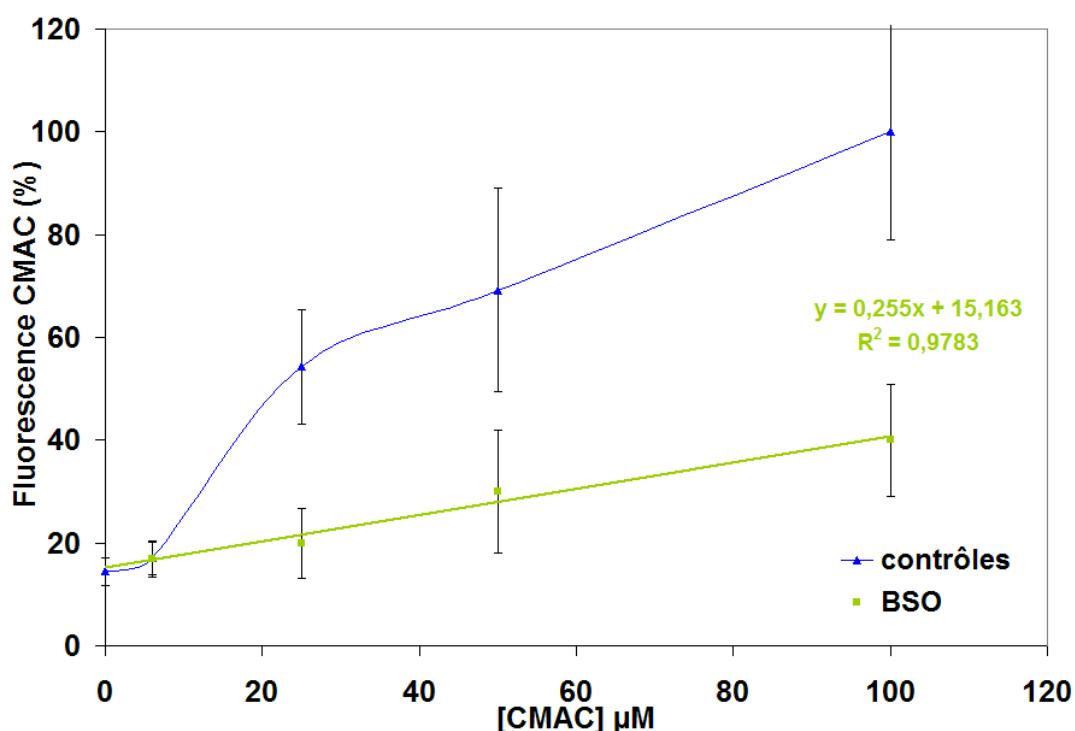


FIGURE 6 – Test de spécificité de CMAC. Les cultures sont exposées à 1 μM de BSO pendant 24 heures avant coloration avec la sonde CMAC à différentes concentrations.

Procédure

Les cultures sont lavées 2 fois avec du milieu de culture chaud (37°C) puis incubées 20 minutes, à 37°C et dans le noir, dans du milieu préchauffé contenant 10 μM de DHR 123 (D-632, Invitrogen, Molecular Probes). La solution de coloration est diluée à partir d'une solution stock à 5 mM préparée dans du DMSO et conservée dans l'azote liquide. Suite aux 20 minutes d'incubation les cultures sont lavées deux fois avec du milieu de culture chaud puis incubées à nouveau 10 minutes avant l'observation au microscope BXFM Olympus équipé d'un objectif IMPlanFI 20 x).

Mesure de la fluorescence

Pour une analyse cellule à cellule, la coloration à la DHR 123 est elle-même utilisée en colorant de référence. En effet, les mitochondries, de par leur rôle dans la production d'ATP à partir de l'oxygène, produisent constamment des EROs. Ce niveau basal de production de EROs est utilisé comme base pour la détermination des ROI correspondant à chaque cellule. L'image de la sonde DHR 123 est donc seuillée puis binarisée afin de définir chaque ROI (utilisation de la macro N°1 en annexe C page 169). La mesure de la fluorescence dans ces ROI est ensuite effectuée automatiquement par transposition des ROI sur les images originelles de la DHR 123 (Macro N°2 en annexe C page 169).

7 Analyse de l'apoptose par essai TUNEL

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est une forme physiologique de mort cellulaire hautement régulée, nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Typiquement, les cellules d'organismes multicellulaires s'autodétruisent lorsqu'elles sont endommagées ou lorsqu'elles sont dysfonctionnelles. Il existe principalement 2 voies d'induction de l'apoptose dans la cellule : la voie mitochondriale est induite par la relâche de protéines mitochondriales et la voie des récepteurs à domaine de mort situé dans la membrane plasmique. Lors de l'apoptose, les cellules sont d'abord modifiées au niveau physiologique. Le premier point de non retour dans l'apoptose induite par la voie mitochondriale est la relâche de cytochrome c de la mitochondrie et la dégradation du potentiel membranaire mitochondrial. Les caspases sont ensuite activées et celles-ci provoquent la coupure des protéines associées à l'apoptose. Les phosphatidylsérines (PS) sont ensuite transloquées de la face interne de la membrane cellulaire à la face externe (cette translocation peut d'ailleurs être mise en évidence par le test de coloration à l'annexine V). Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose comme la condensation du cytoplasme, du noyau et de la chromatine, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique ainsi qu'une perte de l'asymétrie membranaire sont alors visibles.

Principe de l'essai TUNEL

La plupart des techniques actuellement utilisées dans la détection de départ en apoptose révèlent le phénomène de mort cellulaire programmée lorsque les modifications morphologiques des cellules deviennent apparentes (corps apoptotiques. . .). Le système TUNEL¹, permet la détection du départ en apoptose à un stade précoce par rapport à la création des corps apoptotiques, au moment de la fragmentation de l'ADN nucléaire. Cette étape de fragmentation est la conséquence de l'activation par différentes caspases des endonucléases, clivant l'ADN en des fragments de 180 à 200 paires de bases et laissant des extrémités 3'-OH libres. La fragmentation est mise en évidence par l'ajout au niveau de ces extrémités caractéristiques de nucléotides dUTP (conjugués à la fluorescéine 12) par une enzyme spécifique (la Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Recombinant notée rTdT). Les fragments d'ADN ainsi étiquetés par une queue composée de polymère dUTP-fluorescéine 12, peuvent alors être visualisés directement en microscopie de fluorescence.

Procédure pour la mesure de l'apoptose

Le système TUNEL utilisé est fourni par Promega sous la nomination *DeadEndTM fluorometric TUNEL system*.

Au temps défini après traitement, les cultures sont fixées par immersion dans une solution de PFA 4% pendant 25 minutes à 4°C. Après deux lavages successifs au PBS 1X, les cultures peuvent être conservées pour 24 h au maximum dans du PBS à 4°C. Les cellules sont ensuite perméabilisées au Triton à 0,2% pendant 10 min afin de permettre la pénétration des nucléotides fluorescents et de l'enzyme rTdT dans les cellules. Le triton est éliminé par deux lavages au PBS. Il est important de sécher un maximum la boîte de

1. TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling

culture et la fenêtre de nitrure de silicium (support des cellules lors de l'irradiation) pour retirer le liquide éventuellement présent.

Parallèlement, des **contrôles positifs** sont préparés dans le but de vérifier l'efficacité du protocole. Ces témoins positifs correspondent à des cellules MC3T3 cultivées sur des lamelles et exposées à l'enzyme DNase I (incubation des cultures avec 100 μL de tampon DNase I de 5,5 à 10 unités/mL d'enzyme pendant 10 min). La DNase I clive l'ADN nucléaire simulant ainsi un départ en apoptose.

Dans les étapes suivantes, de faibles volumes de solution sont utilisés. Afin d'optimiser leur action, ces volumes sont maintenus par capillarité sur les cultures via l'utilisation d'un film plastique d'environ 5 cm^2 .

Les cultures sont traitées avec un tampon d'équilibration (100 μL) préparant les cellules à la future réaction enzymatique. Un mélange réactionnel contenant l'enzyme rTdT, les nucléotides fluorescents et le tampon spécifique de l'enzyme est réalisé extemporanément et maintenu sur glace. En parallèle un autre mélange réactionnel ne contenant pas l'enzyme est effectué. Ce dernier permet de réaliser le **témoin négatif**, permettant d'observer l'autofluorescence des cellules ou la fixation aspécifique des nucléotides dUTP-fluorescéine.

Les cultures sont incubées dans 50 μL de mélange réactionnel pendant une heure à 37 °C. La réaction est ensuite arrêtée avec un volume de solution tampon SSC 2X (incubation de 15 minutes). Suite à trois lavages au PBS, les cellules sont colorées par l'iodure de propidium à 1 $\mu\text{g/mL}$ dans le but de repérer les noyaux en microscopie de fluorescence. Cette coloration d'environ 20 minutes est suivie de rinçages au PBS pour enlever l'excédent.

Les fenêtres sont alors montées sur lame via le glycerol¹. Les échantillons sont visualisés au microscope à fluorescence à la longueur d'onde de 520 nm pour la fluorescence verte et à la longueur d'onde de 620 nm pour la fluorescence rouge.

8 Etude du cycle cellulaire : Cytométrie en flux

Principe

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer certains paramètres (taille, granularité...) de cellules entraînées rapidement dans une gaine liquide et amenées une par une dans un faisceau laser. Pour l'étude du cycle cellulaire, on exploite l'aptitude de la cellule à émettre lors de son passage dans le faisceau laser diverses fluorescences par excitation de fluorochromes fixés directement ou indirectement sur l'ADN. Les mesures sont effectuées très rapidement, en général, plusieurs milliers de cellules sont analysées à la seconde (voir Annexe A page 165).

Etude du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en 4 phases principales : G1 (avant réplication ADN), S (réplication du matériel génétique), G2 et M (division cellulaire). S et G2 ont des durées constantes, G1 est variable selon les populations et responsable de la variabilité de l'inter-

1. Dako Cytomation.

phase et donc du cycle cellulaire. C'est l'analyse du contenu en ADN qui permet l'étude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Une limite existe dans la distinction entre cellules en G2 ou M et cellules binucléées et cellules en G1 quiescentes ou différenciées.

Procédure

Les cultures sont trypsinées puis centrifugées 5 minutes à 1100 tours par minutes. Après un lavage au PBS, les cultures sont centrifugées une seconde fois pendant 5 minutes à 1100 tours par minutes, resuspendues puis incubées 15 minutes dans une solution de paraformaldéhyde à 0,5%. Après une dernière centrifugation (5 minutes à 1100 tours par minutes) les cellules sont resuspendues dans une solution de coloration contenant 12,5 μ M de Hoechst. Les noyaux sont analysés sur un automate de type FACS Aria (Becton Dickinson) à une longueur d'onde de 465 nm.

Troisième partie

Résultats

Biocompatibilité et protocole d'irradiation

« Se donner du mal pour les petites choses, c'est parvenir aux grandes, avec le temps. »
Samuel Beckett

Sommaire

1.1	Microfaisceau et biocompatibilité	97
1.1.1	Identification des contraintes	97
1.1.2	Les boîtes de cultures	97
1.1.3	Les cultures cellulaires	99
1.1.4	Le maintien des cultures au sein de l'installation	103
1.1.5	Bilan	103
1.2	Établissement du protocole d'irradiation	103
1.2.1	Simulation de l'irradiation	103
1.2.2	Contrôle du nombre de particules	107
1.2.3	Visualisation des cellules	108
1.2.4	Repérage et enregistrement des positions	110
1.2.5	Position du collimateur et irradiation	112
1.2.6	Cellules ciblées ? cellules voisines ?	113
1.3	Conclusion	113

APRÈS avoir exposé l'état de l'installation au début du projet de thèse, ce chapitre détaille l'ensemble des développements techniques liés à la biocompatibilité de l'installation ainsi que la mise en place du protocole d'irradiation et les conditions expérimentales associées.

1.1 Microfaisceau et biocompatibilité

Afin d'optimiser la pratique de la biologie cellulaire au sein de l'installation, différentes contraintes inhérentes à l'installation elle-même et à la mise en place d'études radiobiologiques doivent être prises en compte.

La direction du faisceau est verticale et l'irradiation s'accomplit par le dessous. Cette configuration impose l'observation des cultures par le dessus *via* le microscope à épifluorescence. Les boîtes de cultures peuvent être disposées de façon standard (dans le plan horizontal) et doivent permettre le maintien de cultures en croissance. A partir de là, les contraintes dont il a fallu tenir compte pour développer ces puits sont multiples.

1.1.1 Identification des contraintes

Les cellules doivent adhérer sur un support pour éviter tout mouvement, aussi léger soit-il, pendant l'irradiation ou pendant le déplacement des boîtes. En fonction du type cellulaire étudié, une bonne adhésion des cellules doit être obtenue sur le support de culture, éventuellement avec l'aide d'un facteur d'adhésion.

La géométrie des boîtes doit être compatible avec le fait que le milieu soit conservé lors de l'irradiation et ce afin d'éviter tout stress supplémentaire des cellules dû à une possible déshydratation. L'épaisseur de ce milieu doit rester cependant assez faible pour permettre une bonne visualisation des cellules avec un objectif de distance frontale raisonnable.

Les matériaux employés pour le support de culture, la boîte elle-même et les matériaux utilisés pour l'étanchéité doivent être parfaitement biocompatibles. De plus, le support doit être suffisamment mince afin de ne dégrader ni l'énergie des ions incidents, ni la résolution spatiale du faisceau. La transparence du support facilite le pré-repérage du champ d'irradiation et de la fenêtre de sortie du faisceau en lumière visible. Le matériau employé pour ce support ne doit pas émettre de lumière de fluorescence sous illumination UV afin d'éviter tout bruit de fond lors du repérage des cellules, qui ne peut être effectué que *via* coloration des cibles par produits fluorescents. Ceci est imposé par l'absence de lumière transmise.

1.1.2 Les boîtes de cultures

L'objectif est de concevoir un type de boîte de culture facilement manipulable, permettant l'irradiation de cellules sur la plateforme d'irradiation par microfaisceau d'ions α . La

conception de ces boîtes de culture doit correspondre aux critères d'encombrement imposés par la plateforme, aux contraintes de matériel imposées par la technique d'irradiation ainsi qu'aux contraintes liées à la pratique de la culture cellulaire.

Le support de culture. Afin de permettre l'irradiation par le dessous, le choix d'un support en nitrure de silicium a été adopté. Ces fenêtres sont disponibles commercialement, en dimensions variées (Silson). La membrane en nitrure de silicium ne fluoresce pas sous UV et est transparente. Comme les contraintes liées à la géométrie de l'installation enjoignent l'utilisation de la fluorescence lors du repérage des cibles, des fenêtres de petites dimensions ont été choisies (présentées en figure 1.1) afin de limiter la taille des échantillons de culture et ainsi limiter l'exposition aux UV du microscope. Ainsi, une fenêtre est considérée comme un puits de culture. La cultureensemencée sur cette fenêtre est observable en un seul champ du microscope.

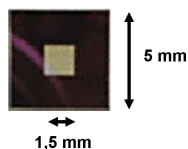


FIGURE 1.1 – Fenêtre en Si_3N_4 , support de culture cellulaire (Silson). Le cadre de la fenêtre maintenant la membrane de Si_3N_4 est de 5 mm de côté et une épaisseur de 200 μm . La membrane en Si_3N_4 a une dimension de 1,5 mm de côté et une épaisseur de 200 nm. La surface de la fenêtre d'irradiation est donc de 2,25 mm^2 .

La boîte de culture. Afin de faciliter la manipulation de la fenêtre d'irradiation, cette dernière doit être insérée dans une structure de maintien. Inspiré des boîtes de cultures développées au LIPSION, un type de boîte de Pétri standard, de petite taille (boîte Nunc, de dimensions externe 60 \times 15 mm) est utilisé pour cette fonction. Ce type de boîte est classiquement utilisé en biologie cellulaire et facilement accessible dans le commerce.

Le socle de ces boîtes doit être modifié afin de permettre l'insertion en son centre de la fenêtre d'irradiation. La réflexion sur les modifications à apporter à la pièce constitue le point principal de la conception des puits de cultures cellulaires. Cette dernière s'est déroulée en trois étapes, présentées en figures 1.3a, 1.3b et 1.3c page 101.

Dans la configuration finale adoptée, la boîte de Pétri est usinée sur trois niveaux. La fenêtre d'irradiation est insérée au niveau intermédiaire, ce qui permet de la centrer et de la protéger des frottements possibles lorsque la boîte est posée sur un plan de travail. Le niveau supérieur permet de rendre accessible la surface en Si_3N_4 pour l'ensemencement de cellules. L'épaisseur de ce niveau supérieur est faible (0,2 mm) afin de limiter la rétention des liquides et faciliter les lavages. L'espace libéré par l'usinage du niveau inférieur diminue les contraintes d'encombrement pour la mise en place de la boîte au dessus de la sortie du faisceau (schéma 1.2 page suivante).

Assemblage du support de culture et de la boîte. La fenêtre d'irradiation est insérée au niveau intermédiaire de la boîte de Pétri, scellée dans cet espace grâce à de la cire à base de paraffine garantissant l'étanchéité de l'ensemble. La fenêtre

étant insérée par le dessous de la boîte, la cire n'est donc pas en contact avec la culture cellulaire et n'induit donc pas de cytotoxicité. L'avantage de cette méthode d'assemblage est de permettre le détachement de la fenêtre d'irradiation afin d'utiliser cette dernière comme une lamelle classique lors de l'observation des culture et de l'analyse de la réponse cellulaire par microscopie de fluorescence.

Les boîtes ainsi modifiées (figure 1.3d page 101) permettent la croissance de cultures cellulaires en présence d'un grand volume de milieu de culture et en condition stérile.

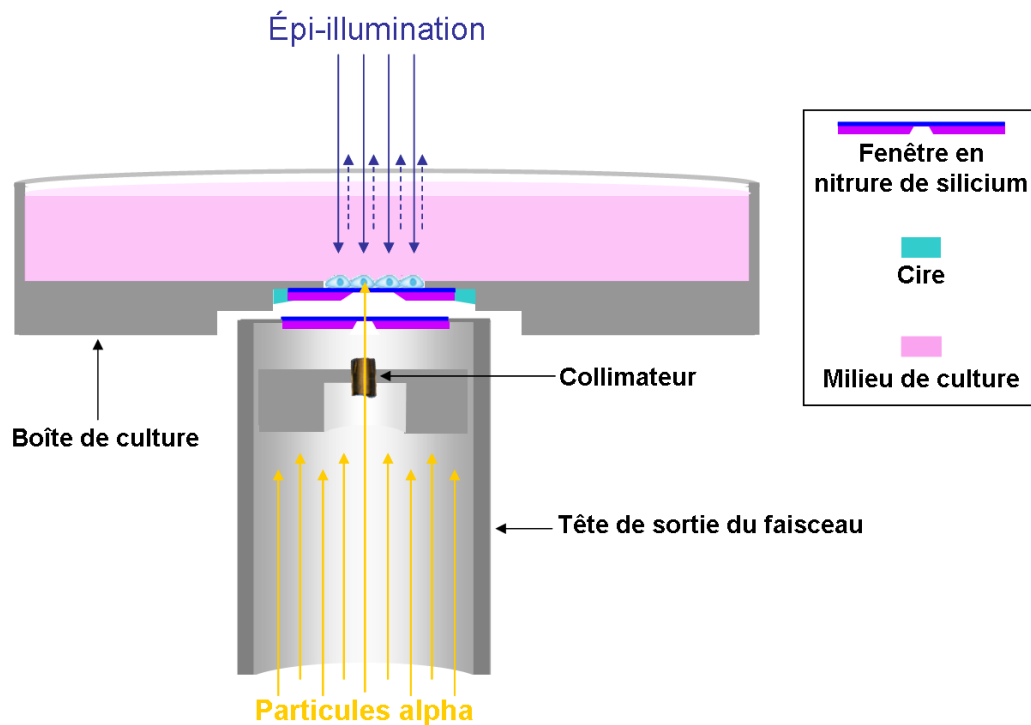
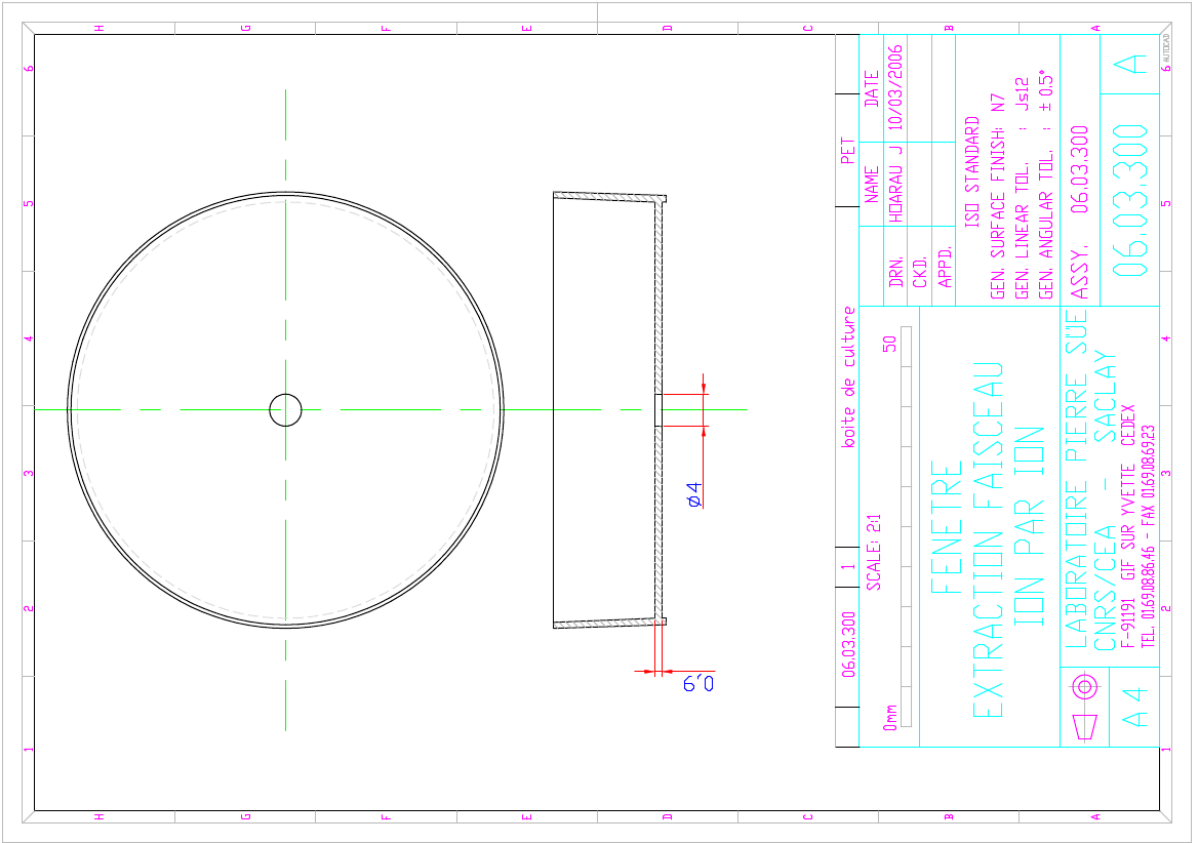


FIGURE 1.2 – Schéma représentant la configuration en coupe transversale de la boîte de culture au sein de l'installation d'irradiation. Les échelles sont volontairement infidèles afin de mieux appréhender la géométrie du système.

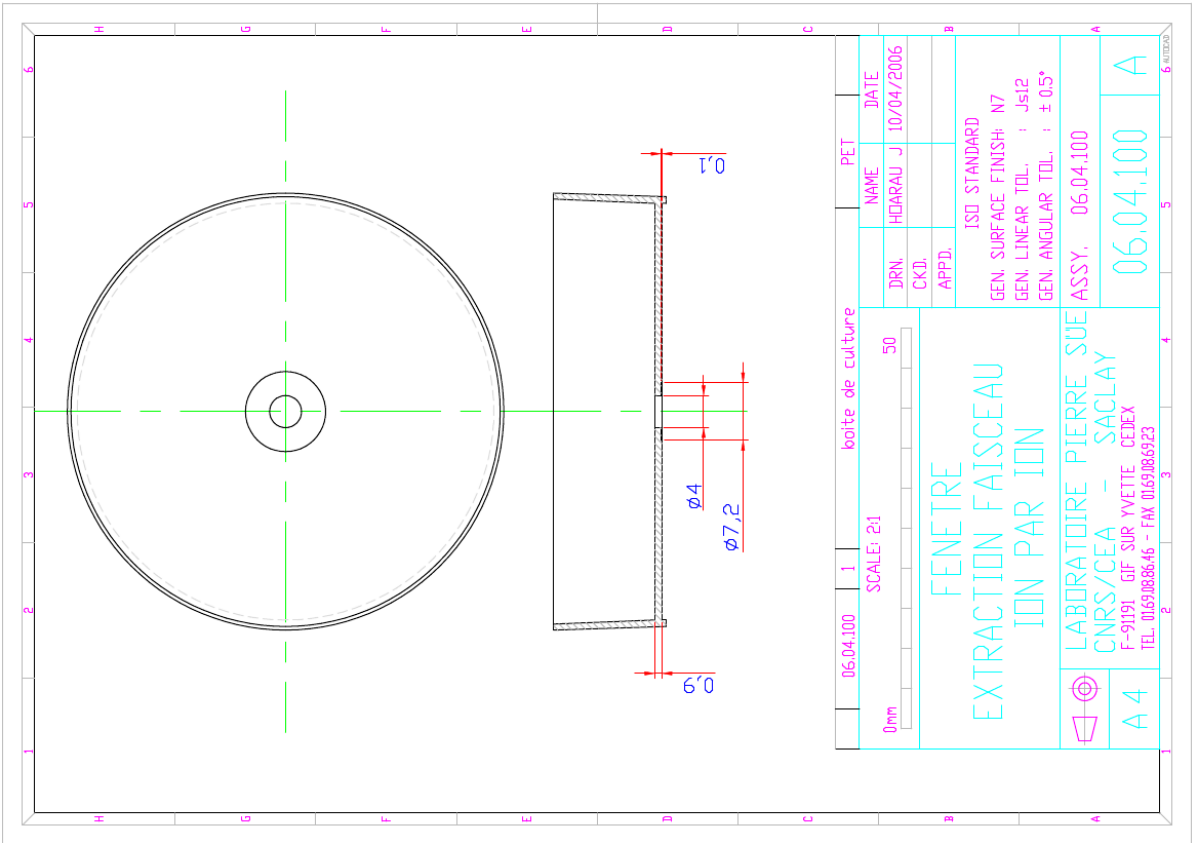
1.1.3 Les cultures cellulaires

Les boîtes de culture spécialement modifiées pour l'irradiation présentent l'avantage de permettre une manipulation aisée et en routine. Cependant les paramètres d'ensemencement des cultures cellulaires doivent être définis.

Les cultures sontensemencées au niveau de la membrane en nitrure de silicium. Cette dernière est dans un premier temps recouverte de poly-L-lysine afin de faciliter l'adhésion des cellules. Ensuite, pour limiter la surface d'ensemencement, un cylindre de clonage est utilisé au moment du dépôt des cellules et est maintenu jusqu'à adhésion de ces dernières.



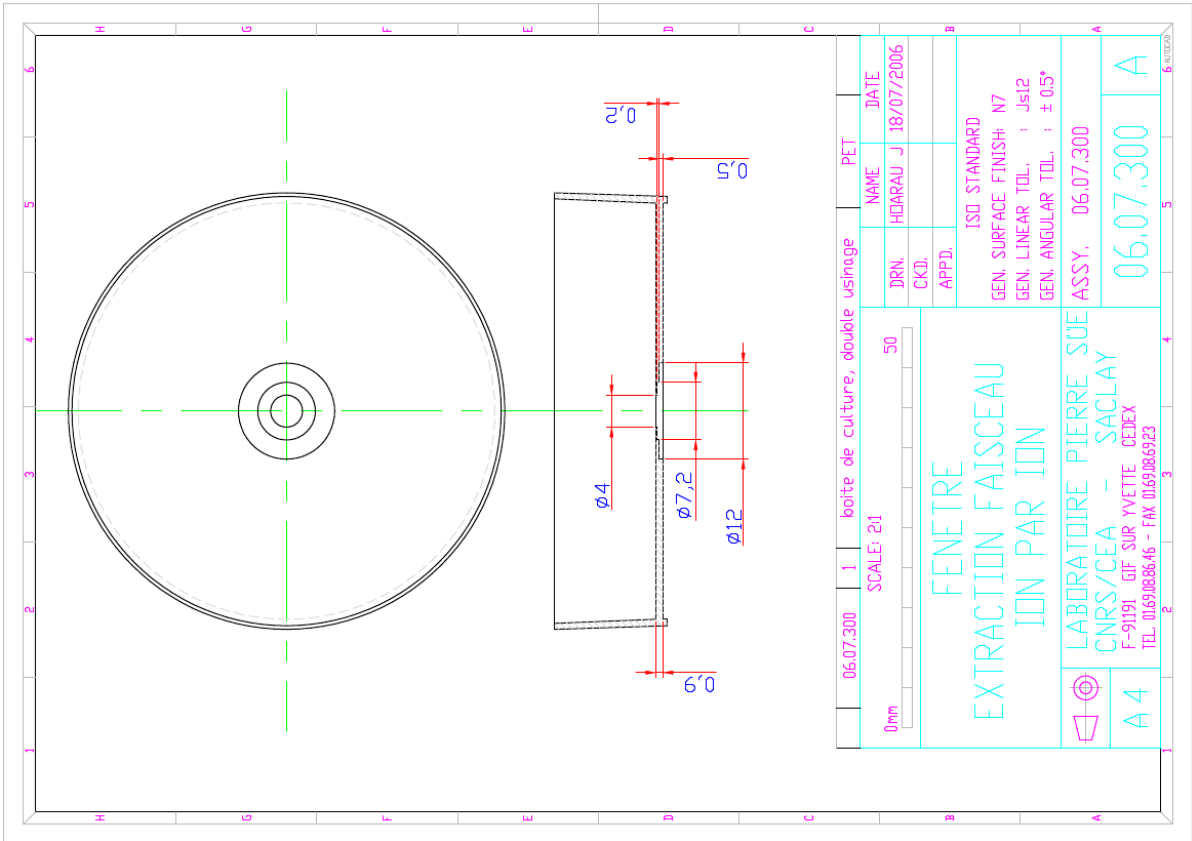
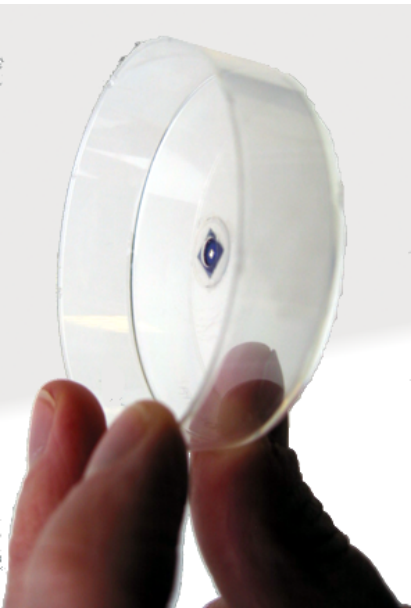
(a) Dessin de définition des premières modifications effectuées sur les boîtes de culture. La boîte est percée sur un niveau unique. La fenêtre de culture doit être collée par le dessous. Dans cette configuration la membrane en nitrure de silicium est non protégée.



(b) Dessin de définition des deuxièmes modifications effectuées sur les boîtes de culture. La boîte est percée sur deux niveaux. La fenêtre est protégée par l'insertion dans l'encoche inférieure.

FIGURE 1.3 – Évolution des différentes modifications effectuées sur les boîtes de culture. Les dessins de définitions ont été réalisés par Jim Hoarau sur Autocad.

(d) Boîte de culture modifiée pour permettre l'irradiation par microfaisceau (réalisée selon le dessin (c) ci-contre). Au centre de la boîte est insérée dans le niveau intermédiaire une fenêtre en nitrure de silicium, support de la culture cellulaire.



(c) Dessin de définition des modifications finales spécifiant la conformation des boîtes de culture utilisées pour la réalisation de cette étude. La boîte est percée sur trois niveaux. La membrane en nitrure de silicium est protégée par son insertion dans le niveau intermédiaire. Le niveau supérieur épais de 0,2 mm limite la rétention des liquides.

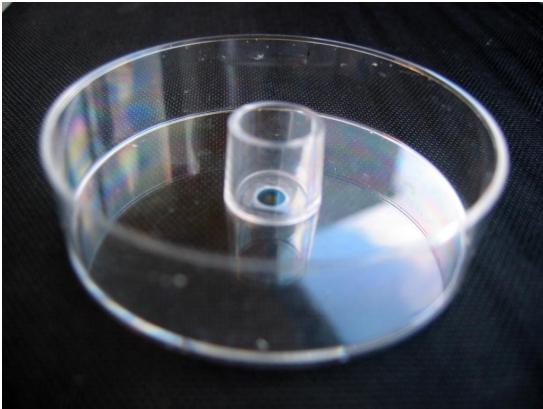


FIGURE 1.4 – L'ensemencement des cultures pour l'irradiation par microfaisceau d'ions est réalisé avec l'aide d'un cylindre de clonage afin de limiter le dépôt des cellules au centre de la boîte.

Les cellules sont ensemencées 24 heures avant l'irradiation. La densité d'ensemencement est réalisée de façon à ce que les cellules soient à 80% de confluence au moment de l'irradiation. De cette façon, les cellules sont encore en phase de croissance et la majorité sont en contact physique.

Une étude en cytométrie en flux effectuée à partir de cultures cellulaires MC3T3 à 80% de confluence permet d'évaluer l'état du cycle cellulaire au moment de l'irradiation (figure 1.5).

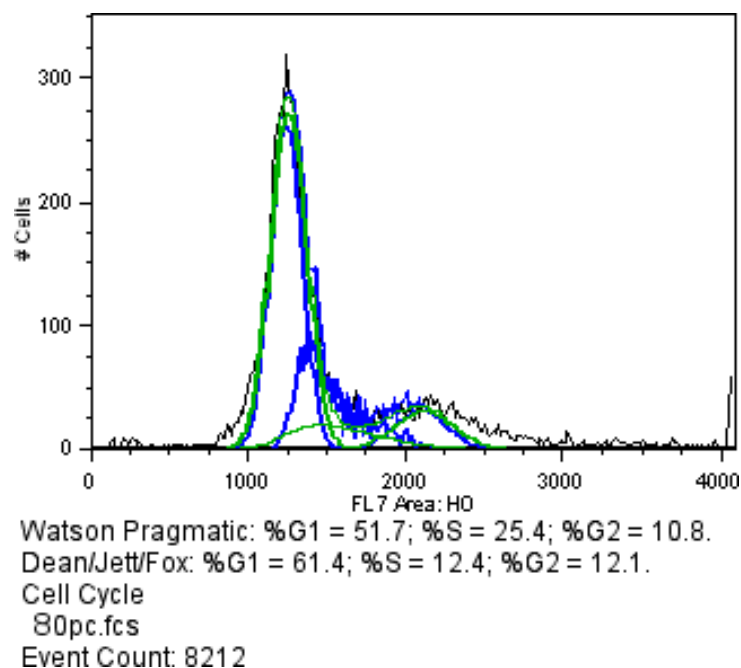


FIGURE 1.5 – Etude du cycle cellulaire des cellules MC3T3 à 80% de confluence.

Les simulations de Watson et Dean/Jett/Fox, en vert et bleu respectivement, permettent d'établir un pourcentage du nombre de cellules dans une phase précise du cycle; lors de l'irradiation, les cellules MC3T3 sont majoritairement en phase G1 du cycle cellulaire (entre 51,7 et 61,4%).

1.1.4 Le maintien des cultures au sein de l'installation

Pour le maintien des cultures au sein de la plateforme lors des observations, repérages, irradiations et analyse, un incubateur maintenant une température constante à 37°C a été mis en place en décembre 2007. Cet incubateur conçu sur mesure (Okolab), englobe le système d'observation, la platine porte échantillon ainsi que la tête de sortie du faisceau (figure 1.6 page suivante).

Au sein de l'incubateur est implantée une chambre micro-environnementale. Montée autour de la platine porte échantillon, cette chambre alimente l'air environnant les boîtes de cultures en humidité ainsi qu'en gaz (mélange air et 5% de CO₂). La platine peut accueillir trois boîtes de culture pour l'irradiation. Ces cultures peuvent être ainsi maintenues sur l'installation durant 24 heures dans des conditions de cultures idéales.

1.1.5 Bilan

La conception des boîtes et la mise en place de l'incubateur associé à la chambre micro-environnementale garantissent le maintien des échantillons biologiques dans des conditions de croissance optimales. En effet, les cellules sont maintenues dans leur milieu de culture non modifié et le volume de ce milieu est suffisamment conséquent pour garantir une bonne inertie de conservation de la température, elle-même entretenue par l'incubateur. La chambre micro-environnementale permet un bon équilibre du pH par les échanges gazeux et l'apport en humidité évite toute déshydratation. La plateforme est donc optimisée pour l'accueil de cellules en culture.

1.2 Établissement du protocole d'irradiation

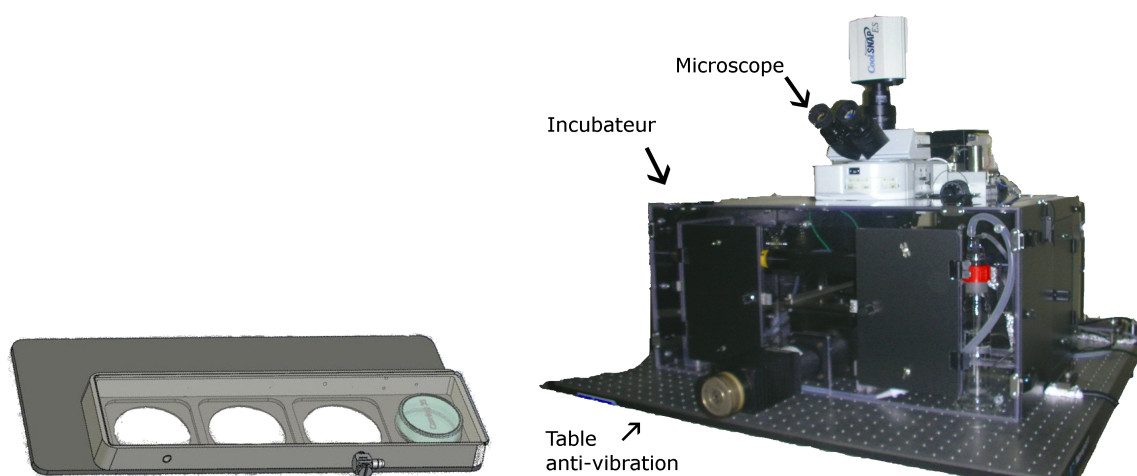
Le protocole d'irradiation doit prendre en compte la géométrie de l'installation, la capacité de l'installation à produire un faisceau d'ions contrôlé ainsi que le système de reconnaissance avant et après irradiation.

Le système doit être capable d'irradier une cible définie, avec un nombre prédéfini de particules α . L'énergie des particules doit être définie de façon à ce que les particules s'arrêtent dans la cellule. L'irradiation étant effectuée par le dessous, l'objectif est de ne pas favoriser l'ionisation du milieu de culture au dessus des cellules qui se produirait si une particule traversait la cellule et stopperait son parcours dans le milieu.

1.2.1 Simulation de l'irradiation

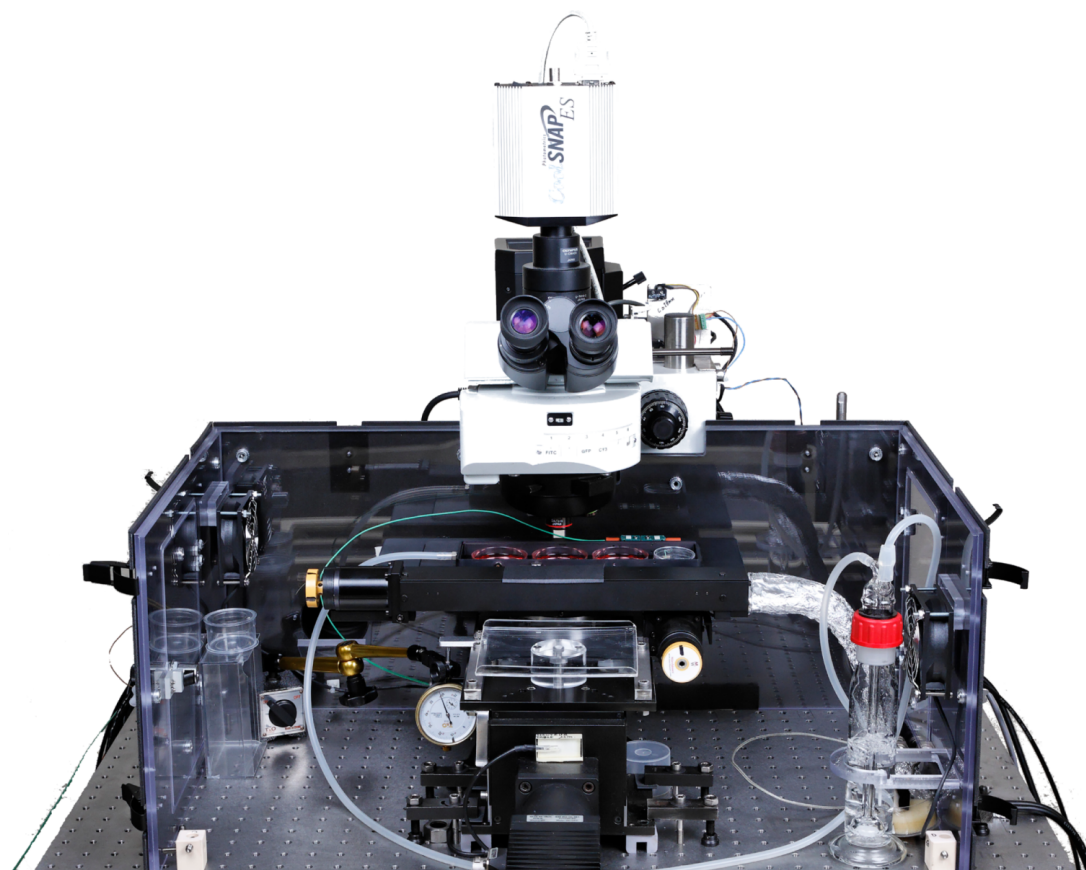
La simulation de l'irradiation permet d'estimer le parcours et l'énergie des particules à partir de l'extraction du faisceau à l'air jusqu'à la cible cellulaire.

Simulation Monte Carlo. SRIM (Stopping and Range of Ions in Matter) est un groupe de programmes dédiés au calcul de la perte d'énergie et du parcours de particules chargées dans la matière. La dernière version disponible est SRIM2008 (©1984-2008,



(a) Schéma représentant la chambre microenvironnementale pouvant accueillir trois boîtes de culture.

(b) Photographie de l'incubateur fermé.



(c) Photographie de l'ensemble de l'installation.

FIGURE 1.6 – Incubateur et chambre micro-environnementale.

James F. Ziegler). Le calcul de transport dans un matériau se base sur le programme TRIM (TRansport of Ions in Matter). Une base de donnée de matériaux composés est disponible.

Le faisceau de particules α a pour énergie incidente 3 MeV. Avant d'atteindre leur cible définie comme étant le noyau cellulaire, les particules doivent traverser différentes couches de matières et de gaz. Sur ce trajet, le rayonnement est susceptible de perdre une partie de son énergie cinétique. La traversée de différents polymères a été simulée afin de reproduire l'expérience d'irradiation de cultures cellulaires. Un calcul détaillé (où chaque collision est simulée) est réalisé. Les matériaux utilisés sont décrits dans la figure 1.7.

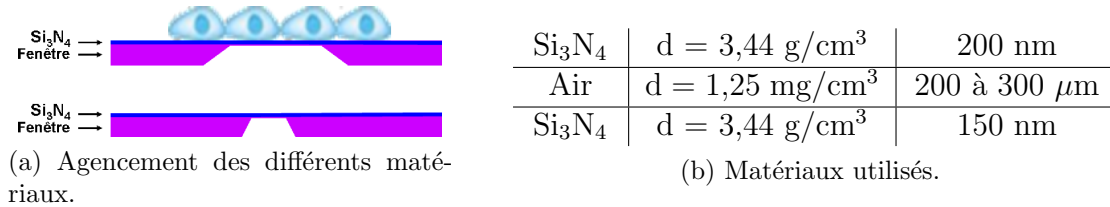


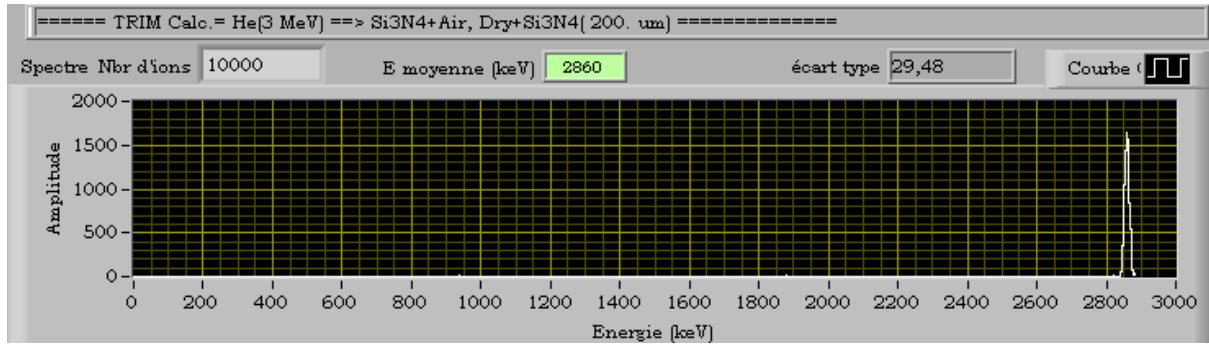
FIGURE 1.7 – Traversée de différents polymères.

Les particules sont en premier lieu extraites à l'air à travers la membrane en nitrure de silicium (de 150 nm d'épaisseur). Elles traversent ensuite une couche d'air puis à nouveau une couche en nitrure de silicium (de 200 nm). L'épaisseur de la couche d'air entre les deux membrane de nitrure de silicium peut varier. Elle est au minimum de 200 μm ; cette distance est obtenue lorsque la fenêtre de sortie du faisceau et le puits de culture sont en contact (elle correspond à l'épaisseur de la fenêtre maintenant la membrane de nitrure de silicium). L'épaisseur maximale de cette couche déterminée selon l'axe Z du microscope est de 300 μm .

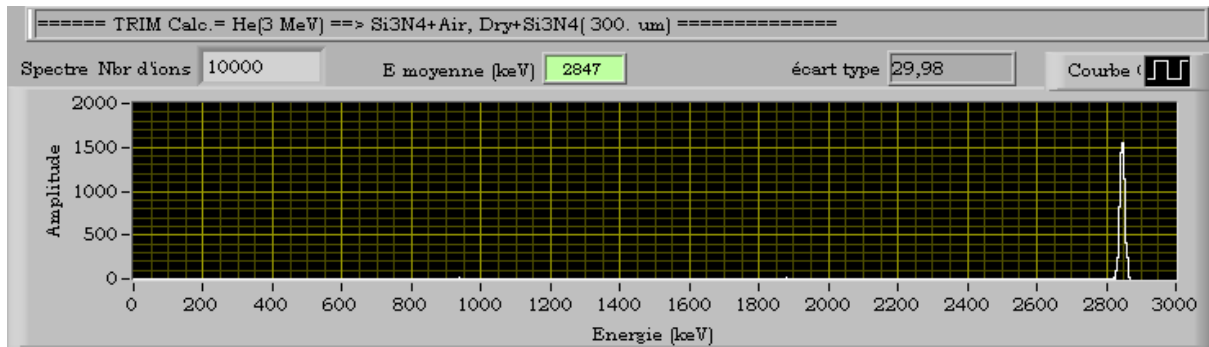
Les simulations permettant d'évaluer la perte d'énergie des particules réalisée *via* le logiciel SRIM2008 sont présentées figure 1.8 page suivante. L'énergie résiduelle des particules au moment de leur pénétration dans une cellule est comprise entre 2,847 et 2,860 MeV en moyenne.

Le parcours des particules. L'énergie des particules conditionne la distance de leur parcours dans la matière. La portée des particules dans un milieu biologique équivalent eau (c'est-à-dire la profondeur atteinte dans ce milieu depuis le point d'incidence) est estimée par le programme ASTAR (Stopping Power and Range Tables for Alpha Particles) fourni en ligne par l'institut national des standards et technologies des États Unis. Le tableau 1.1 page suivante présente le parcours correspondant de particules α pour des énergies allant de 1 à 3,5 MeV.

Selon ces données, les particules α d'une énergie de 2,847 à 2,860 MeV parcourent dans un milieu équivalent eau, une distance de 15,06 à 15,15 μm .



(a) Simulation Monte Carlo déterminant l'énergie résiduelle de particules alpha de 3 MeV après avoir traversé successivement la membrane en Si_3N_4 de $150\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, la couche d'air de $200\ \mu\text{m}$ puis la membrane en Si_3N_4 de $200\ \mu\text{m}$.



(b) Simulation Monte Carlo déterminant l'énergie résiduelle de particules alpha de 3 MeV après avoir traversé successivement la membrane en Si_3N_4 de $150\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, la couche d'air de $300\ \mu\text{m}$ puis la membrane en Si_3N_4 de $200\ \mu\text{m}$.

FIGURE 1.8 – Simulations Monte Carlo (SRIM2008).

Énergie cinétique (MeV)	Pouvoir d'arrêt ($\text{KeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$)	Parcours (μm)
1,000	251	5,17
2,000	183	9,85
2,500	159	12,78
2.847	146	15,06
2.860	145	15,15
3,000	140	16,13
3,500	125	19,91

TABLE 1.1 – Estimation par le programme ASTAR du pouvoir d'arrêt et du parcours des particules α dans un milieu équivalent eau en fonction de leur énergie (<http://physics.nist.gov>).

Il est en réalité difficile d'estimer l'épaisseur d'une cellule en culture, néanmoins, cette simulation démontre le parcours de ces particules dans le milieu de culture surplombant les cellules est minimisé.

1.2.2 Contrôle du nombre de particules

Le contrôle du nombre de particules délivrées par cible est réalisable selon deux méthodes. La première consiste à mettre en place un détecteur de particules au dessus de la culture cellulaire et ainsi dénombrer les ions traversant l'échantillon. La deuxième méthode quant à elle consiste à placer un détecteur en transmission entre le faisceau et la culture cellulaire, ce détecteur émettant des photons au passage des particules, un photo multiplicateur placé au dessus de la culture permet leur dénombrement (les méthodes de dénombrement sont décrites dans la section 3.3.5 page 64).

Au laboratoire Pierre Süe, l'énergie du faisceau incident (3 MeV) et le positionnement des boîtes lors de l'irradiation sont définis de façon à ce que les particules α stoppent leur parcours dans la cellule ciblée, afin de minimiser l'ionisation du milieu et la propagation de radicaux libres pouvant biaiser la réponse cellulaire. Le nombre de particules délivrées par cellule ne peut donc pas être effectué *via* l'installation d'un détecteur. D'autre part, la détection des particules par le biais d'un plastique placé entre la sortie du faisceau et la culture cellulaire couplé avec un photo-multiplicateur influerait fortement sur la qualité du faisceau ainsi que la qualité des conditions de cultures cellulaires (par la nécessité de coupler un photomultiplicateur au dessus des cultures ce qui est non compatible avec la chambre micro-environnementale). C'est pourquoi le nombre de particules délivré par cible est par conséquent basé sur le flux du faisceau incident ; le faisceau de particules α est maintenu à une fluence extrêmement faible de façon à déterminer statistiquement le temps nécessaire pour le passage du nombre de particules désiré (voir le système d'éta-lonnage section 1.3 page 78).

Ainsi, pour recevoir un nombre donné de particules, les cellules sont maintenues au dessus du collimateur pendant le temps mesuré. Dans cette configuration, la reproductibilité des irradiations est assurée avec un minimum de 10 particules α en moyenne par cible (Khodja et al., 2006). La figure 1.9 page suivante présente la capacité de ciblage du faisceau : 90% des particules α issues du faisceau atteignent leur cible (cercle de 10 μm de diamètre correspondant à la taille d'un noyau). Un platic CR39 est irradié en prenant le modèle d'une mosaïque de noyaux cellulaires, chacun recevant 10 particules. La révélation du CR39 permet de mettre en évidence l'impact de ces particules α , la superposition de cette image à l'image originelle (mosaïque de noyau) montre la localisation de l'irradiation.

Durant l'irradiation le faisceau n'est pas stoppé. Afin d'éviter l'irradiation en dehors des cibles, plusieurs précautions sont engagées :

- Le temps de délivrance de 10 particules à chaque position d'irradiation doit être relativement long (de l'ordre de la seconde). Ainsi, un nombre négligeable de particules sera délivré sur le chemin entre deux positions d'irradiation.

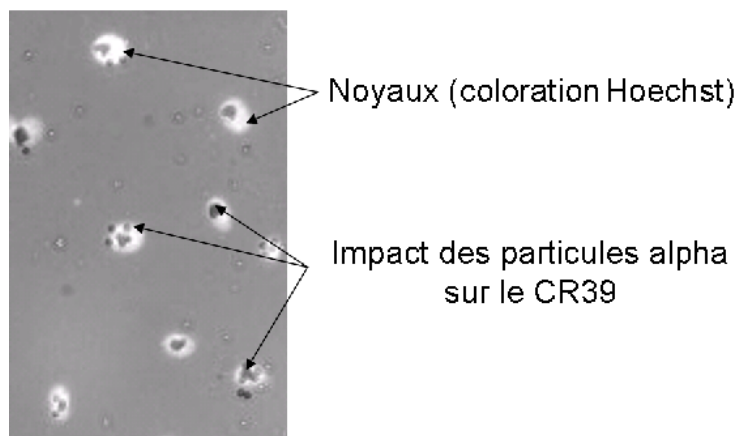


FIGURE 1.9 – Position relative des impacts des particules α sur un plastic CR39 comparativement à la position des noyaux.

- La distance entre deux points d'irradiation doit être minimisée.

Dans cette configuration d'irradiation, une série de trois boîtes placées au sein de l'installation est irradiée en 30 minutes. Cette période de temps comprenant la mise en place des boîtes, le repérage des cibles et l'irradiation elle-même.

1.2.3 Visualisation des cellules

Le champ d'observation

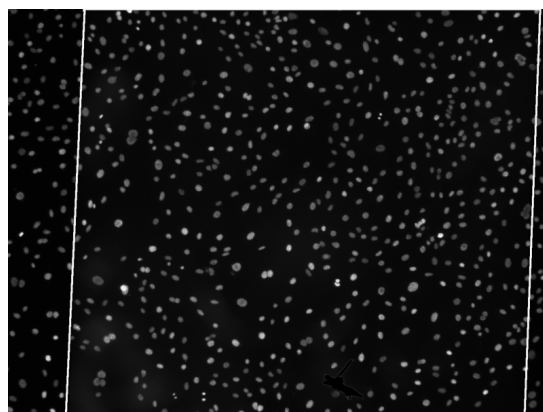
Les cellules à irradier sontensemencées sur une surface de $2,25 \text{ mm}^2$. Le choix de l'objectif pour l'observation des cultures résulte d'un compromis entre précision souhaitée, temps d'acquisition vidéo, taille du champ et distance de travail. En effet, les objectifs à fort grossissement présentent généralement une ouverture plus faible, ce qui augmente considérablement le temps d'acquisition d'une image. En outre, plus le grossissement est important, plus la taille du champ sera faible. La distance de travail se trouve également réduite lorsque l'on augmente le grossissement, ce qui peut poser problème lorsque les cellules sont visualisées à travers le milieu de culture.

La visualisation des cultures au sein de l'installation est réalisée via le microscope à fluorescence Olympus BXFM surplombant la platine porte-échantillon. Les cellules sont observées en un seul champ avec un grossissement 50 (figure 1.10a page suivante). Lorsque les échantillons en position d'irradiation sont visualisés en lumière blanche, ce champ permet l'observation des cellules en culture sur la membrane en nitrure de silicium, du contour de cette membrane ainsi que de la fenêtre de sortie du faisceau dans un plan focal inférieur (La fenêtre de sortie du faisceau est située 200 à 300 μm en dessous).

Cette position est définie comme la position zéro de la boîte. Les contours de la membrane Si_3N_4 , support de la culture cellulaire, définissent les limites maximales de la zone d'irradiation.



(a) Visualisation du puits de culture en lumière blanche.



(b) Visualisation des noyaux cellulaires pour le puits de culture correspondant à l'image (a) en fluorescence (filtre U-MWU2 : excitation 330-385 et émission 420). Coloration Hoechst 1 μ M pendant 30 minutes.

FIGURE 1.10 – Visualisation des cultures cellulaires.

Le noyau cellulaire est défini comme cible de l'irradiation. Afin de distinguer clairement les cibles d'autres entités de taille comparable, les cellules doivent être marquées à l'aide d'un colorant vital permettant de distinguer le noyau cellulaire en utilisant un colorant spécifique de la chromatine. La plupart de ces colorants émettent dans le domaine visible lorsqu'ils sont excités dans l'ultraviolet. Le colorant vital Hoechst 33342 a été sélectionné (figure 1.12a page 111).

Le temps moyen nécessaire à la mise au point et à la capture d'image est de 10 secondes.

L'identification des cibles

Le Hoechst pénètre dans les cellules vivantes pour se fixer au niveau des régions d'ADN riches en A et T. Ce colorant est intensément employé dans la communauté des radiobiologistes travaillant sur microfaisceau, son utilisation est donc bien référencée (Yasui et al., 2007). Le Hoechst étant un intercalant de l'ADN, il peut favoriser l'apparition de mutations ou de lésions. Ces effets semblent être négligeables à faible concentration (Durand and Olive, 1982) mais peuvent être accentués par l'exposition aux UV du microscope lors de l'observation.

Afin de déterminer l'indice de cytotoxicité 50 (IC50) du Hoechst 33342 couplé à l'éclairage aux UV du microscope, le test MTT permettant de mesurer la cytotoxicité en terme de mort cellulaire est effectué (figure 1.11 page suivante). Ce test est réalisé 10 minutes et 24 heures après incubation des cultures dans différentes concentrations de Hoechst pendant 30 minutes puis exposition aux ultraviolets pendant 10 secondes. Ce temps correspond à la durée moyenne d'une exposition lors de la mise au point pour l'observation d'un puits de culture.

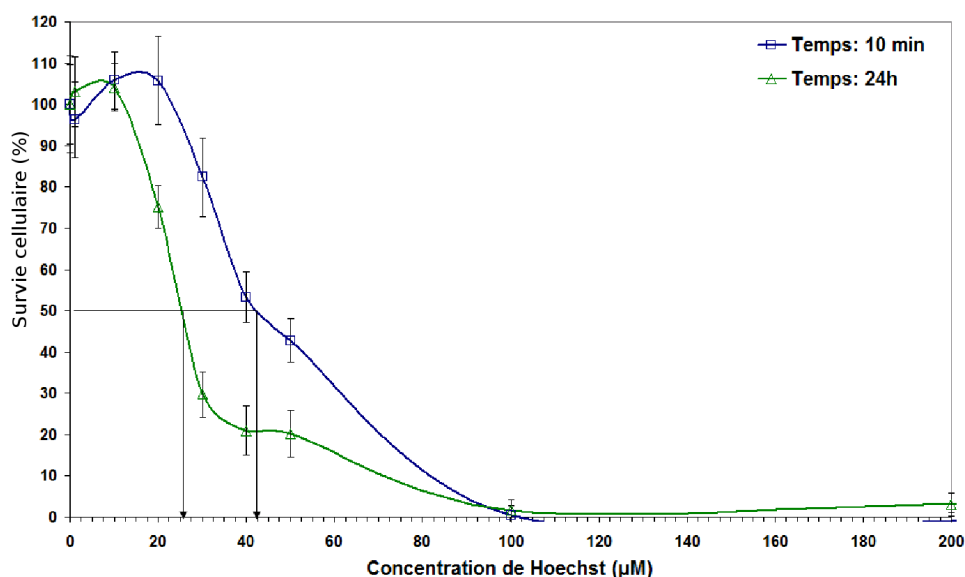


FIGURE 1.11 – Test de mortalité cellulaire induite par incubation des cultures MC3T3 avec différentes concentrations de Hoechst puis éclairée 10 secondes aux UV du microscope.

Le test MTT met en évidence que la coloration au Hoechst couplé aux UV entraîne des conséquences létales s'accroissant avec le temps. En effet, la dose létale pour 50% de la population cellulaire diminue; au temps le plus court (10 minutes) l'IC₅₀ du Hoechst est de 42 μ M alors que 24 heures plus tard, il n'est que de 26 μ M.

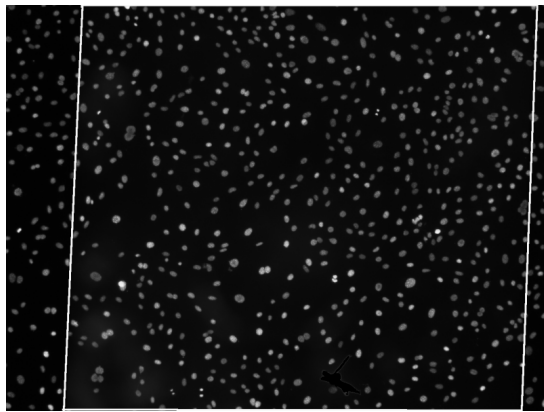
Afin de limiter la toxicité chimique, la concentration de Hoechst la plus petite possible doit être utilisée. La coloration doit néanmoins permettre une observation des noyaux en microscopie de fluorescence et ce avec un temps d'exposition le plus court possible, soit 10 secondes. Cette concentration déterminée par test visuel correspond à 1 μ M.

L'utilisation du Hoechst peut potentiellement biaiser la réponse cellulaire observée du fait des conséquences mutagènes. Afin de limiter cela, deux obligations sont imposées aux protocoles d'irradiation :

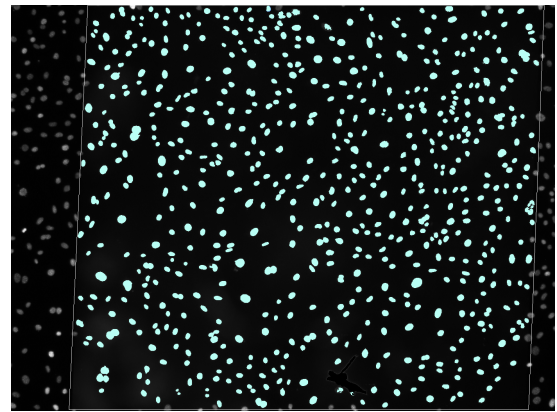
- L'étude de la réponse cellulaire après irradiation doit être comparée à des contrôles correspondant à des cellules mises en culture dans les mêmes conditions de densité et de croissance puis soumises aux colorations au Hoechst et à l'éclairage UV du microscope dans les mêmes conditions de concentration et de temps.
- Afin de limiter les conséquences mutagènes du Hoechst, l'étude de la réponse cellulaire ne sera pas effectuée dans l'intervalle de 24 heures après la coloration au Hoechst (à l'exception du protocole TUNEL).

1.2.4 Repérage et enregistrement des positions

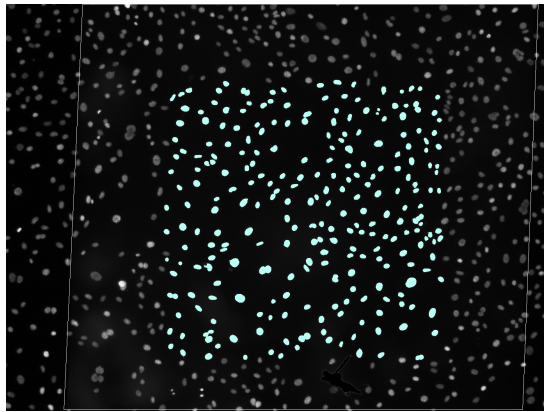
Lors de l'irradiation, le faisceau est maintenu fixe. Dans ce mode de fonctionnement, les repères optique (champ du microscope) et mécanique (déplacement de la platine porte-échantillon) sont utilisés pour l'irradiation. Les cibles sont localisées dans le repère optique



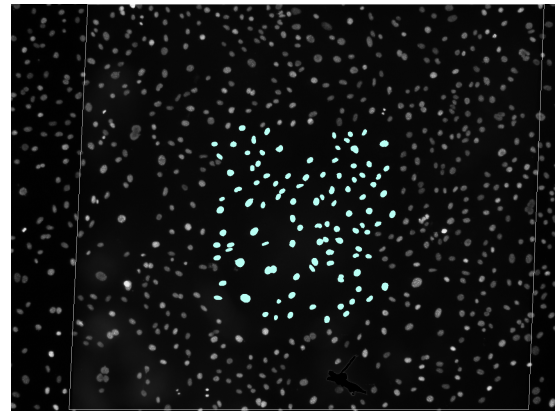
(a) Visualisation des noyaux cellulaires colorés au Hoechst ($1\ \mu\text{M}$).



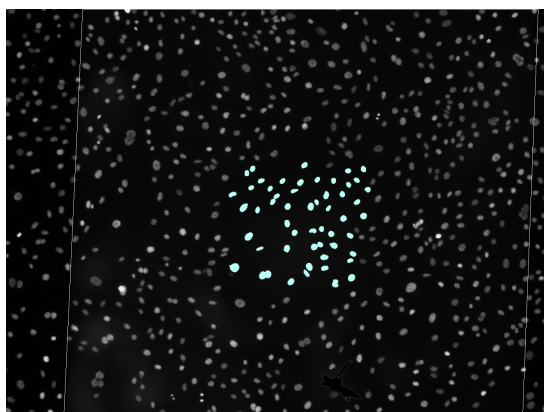
(b) Sélection de 100% de la population cellulaire du puits de culture. Le nombre total de cellules présent dans le puits de culture est de 503.



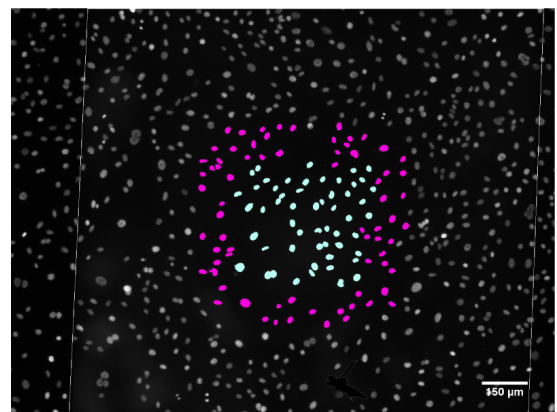
(c) Sélection de 50% de la population cellulaire du puits de culture (soit 250 cellules).



(d) Sélection de 20% de la population cellulaire du puits de culture soit 100 cellules).



(e) Sélection de 10% de la population cellulaire du puits de culture soit 50 cellules).



(f) Identification des cellules *bystander* (en rose) relativement aux cellules irradiées (en bleu). Cas de l'irradiation de 10% de la population cellulaire.

FIGURE 1.12 – Sélection des noyaux irradiés et repérage des populations ciblée et *bystander*. Les couleurs ont été ajoutée informatiquement.

et la platine porte-échantillon se déplace ensuite afin de positionner chaque cible devant le point de sortie du faisceau.

Pour la reconnaissance et la localisation précise des cellules à partir des images optiques acquises par la caméra CCD, des outils de traitement d'image sont utilisés. Ces outils sont issus des fonctions élémentaires du logiciel Image-Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics).

Une image numérique est composée d'un tableau de pixels dont la teinte peut être codée de différentes manières. Nous utiliserons ici des images numériques de type tif codées en niveaux de gris. Chaque pixel est codé sur 16 bits. L'intensité du pixel peut alors varier de 0 à 4095, chaque valeur correspondant à une teinte de gris particulière. Ces images numériques contiennent par ailleurs des objets que l'on peut définir comme un ensemble de pixels en contact que l'on peut regrouper selon certains critères (taille de l'ensemble, intensité, forme ...).

Afin de visualiser les noyaux, les puits de culture sont exposés au Hoechst ($1\text{ }\mu\text{M}$) pendant 30 minutes juste avant l'irradiation. La position zéro de la fenêtre est repérée en lumière blanche puis les noyaux sont visualisés avec un filtre approprié à la longueur d'onde d'excitation et d'émission du Hoechst (355 et 465 respectivement). Le logiciel d'acquisition et d'analyse d'image Image Pro Plus (version 5.1) permet une segmentation de l'image en fonction des nuances de gris. La reconnaissance de forme permet ensuite d'identifier chaque noyau de façon individuelle. La position de leur barycentre, calculé lors de la reconnaissance de forme, est enregistrée. Ces coordonnées seront utilisées comme cibles d'irradiation et transmettent au contrôleur des moteurs gérant le déplacement de la platine.

La numération des noyaux présents dans la zone d'irradiation donne le nombre total de cellules dans le puits de culture. Différentes fractions de cette population peuvent être désignées pour l'irradiation. La figure 1.12 page précédente illustre les cas d'irradiation de 0% à 100% de la population cellulaire.

1.2.5 Position du collimateur et irradiation

Pour être irradiées, les cibles sont déplacées au dessus du collimateur. Sa position est donc déterminée préalablement à la reconnaissance des cibles. Pour visualiser la position du faisceau, un plastique type BC400 est mis en place au dessus de la sortie du faisceau, en position équivalente à une boîte de culture. Lorsque le faisceau (alors réglé à forte fluence) traverse le BC400, ce dernier émet des photons. L'impact du faisceau est observé au microscope en lumière blanche. La reconnaissance de forme permet d'isoler la zone d'impact, ensuite la position de son barycentre est mesurée.

Lors de l'irradiation cette position est référente comme position d'irradiation. Une macro spécifiquement développée sous Labview par Laurent Daudin, gère les déplacements des moteurs de la platine porte-échantillon afin de placer une cible au dessus du collimateur.

1.2.6 Cellules ciblées ? cellules voisines ?

La définition précise des populations ciblées et voisines est une condition primordiale garantissant la répétitivité des expérimentations et des mesures. En effet, afin d'identifier la réponse cellulaire après l'irradiation, il est nécessaire de définir *a priori* les cellules de chaque population.

Définition des cellules ciblées et voisines

Les cellules ciblées sont définies au moment de l'irradiation. Ces cellules correspondent à celles dont la position des noyaux ont été sélectionnées et enregistrées avec le logiciel Image Pro Plus. Ces cellules reçoivent dix particules α au niveau du noyau.

L'effet de voisinage fait intervenir deux voies communications : par l'intermédiaire des jonction communicante ou par la sécrétion de facteurs solubles dans le milieu. Les cellules *bystander* sont définies comme toute cellule dont le noyau est localisé dans un cercle de 300 μm de diamètre autour d'une cellule ciblée. Afin de n'occulter aucune de deux voies de communication, la nécessité d'un contact physique entre les cellules est considéré comme un pré-requis ; une cellule isolée présente dans les limites de ce cercle de 150 μm de rayon n'est pas considérée comme une cellule *bystander*. La figure 1.12f page 111 illustre cette définition.

Identification des populations ciblée et voisine après irradiation

L'analyse de la réponse cellulaire est effectuée directement sur le support de culture *via* l'utilisation de protocoles de fluorescence. Ces protocoles nécessitant une observation par des grossissements élevés, le support de culture ne peut être visualisé en un seul champ. L'utilisation de grossissement de l'ordre de 200 x nécessite la multiplication des champs d'observation puis la reconstitution de l'image du support de culture. La position des cellules irradiées est déterminée ensuite par la reconnaissance visuelle de la mosaïque formée par les noyaux. Une fois la position des cellules ciblées retrouvée, celle de la population voisine est déterminée.

1.3 Conclusion

La plateforme d'irradiation est parfaitement adaptée à l'accueil de cultures cellulaires et est opérationnelle pour l'irradiation ciblée. La définition des cellules cibles et voisines permet une observation **indépendante** de la réponse cellulaire. En effet, chaque cellule de la population irradiée reçoit 10 particules α , la dose équivalente moyenne reçue par une cellule de cette population est donc toujours la même, quelque soit la fraction irradiée de la population globale. De même, chaque cellule de la population voisine, ne reçoit aucune particule ; la dose reçue par une cellule de la population *bystander* est donc nulle.

La plateforme d'irradiation couplée à la méthodologie d'analyse cellule à cellule permet

donc l'étude de l'effet de voisinage. La notion d'irradiation localisée au noyau cellulaire permet de considérer la culture cellulaire comme un système binaire où une cellule est soit irradiée, soit non irradiée. L'étude de la réponse cellulaire n'est pas observée en fonction de la dose recue mais en fonction de l'environnement de chaque cellule ; il s'agit d'observer la réponse d'une cellule, irradiée ou non, en fonction de son environnement cellulaire, c'est-à-dire entourée de différentes proportions de cellules irradiées.

2

Caractérisation de la réponse de la population ciblée et voisine

*« Découvrir consiste à voir comme tout le monde et à réfléchir comme personne. »
Albert Szent Györgyi*

Sommaire

2.1	Dynamique d'apparition des foyers de réparation des cassures double brin	117
2.2	Apoptose radio-induite	118
2.3	Le test des micronoyaux	119
2.3.1	Induction de micronoyaux dans la population globale . . .	120
2.3.2	Induction de micronoyaux dans la population ciblée et voisine	121
2.3.3	La catastrophe mitotique	122
2.4	Conclusions	126

L'IRRADIATION PAR MICROFAISCEAU D'IONS permet une irradiation localisée au noyau avec 10 particules α en moyenne. Le système de repérage des cellules avant et après irradiation rend possible une identification des populations ciblées et voisines.

L'objectif de ce chapitre consiste à caractériser la réponse cellulaire suite à l'irradiation par microfaisceau afin de déterminer l'existence puis l'importance de l'effet de voisinage pour le type cellulaire MC3T3-E1. Cette caractérisation est établie en terme d'évènements macroscopiques tels que l'induction de dommages à l'ADN et la mort cellulaire en fonction de la fraction cellulaire irradiée ou en fonction du temps post-irradiation.

2.1 Dynamique d'apparition des foyers de réparation des cassures double brin

L'atteinte de l'intégrité de l'ADN est l'une des premières conséquences des radiations ionisantes. La génération de cassures à l'ADN est particulièrement délétère pour la cellule en cas de non ou mauvaise réparation. Les cassures double brin sont singulièrement critiques de par leur réparation par le système « infidèle » NHEJ (figure 2.8 page 34).

L'immunodétection des protéines γ H2AX et 53BP1 (protéines initiant le recrutement des systèmes de réparation de l'ADN) permet le repérage des cassures double brin de l'ADN (Rothkamm and Lobrich, 2003). Afin de caractériser temporellement la réponse de la population ciblée et voisine, ces foyers sont quantifiés noyau par noyau.

L'induction des foyers de réparation des CDBs est observé suite à l'irradiation par microfaisceau d'ions α de 10% de la population cellulaire (figure 2.1).

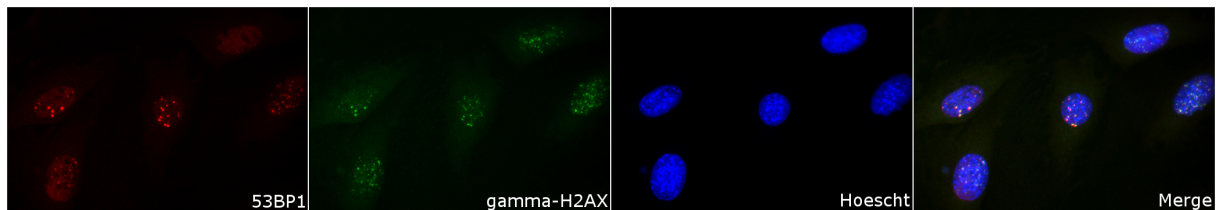


FIGURE 2.1 – Exemple d'immunodétection de γ H2AX et 53BP1. Cas de cellules MC3T3-E1 irradiées par microfaisceaux avec 10 particules α par noyau.

Ces foyers sont quantifiés noyau par noyau en identifiant population ciblée et *bystander*. La figure 2.2 page suivante représente la cinétique de réparation des CDBs en fonction du temps post-irradiation (de 30 minutes à 24 heures).

Le nombre de foyers de réparation de l'ADN augmente dans la population ciblée dès 30 minutes après irradiation, alors qu'aucune variation n'est observée dans la population voisine.

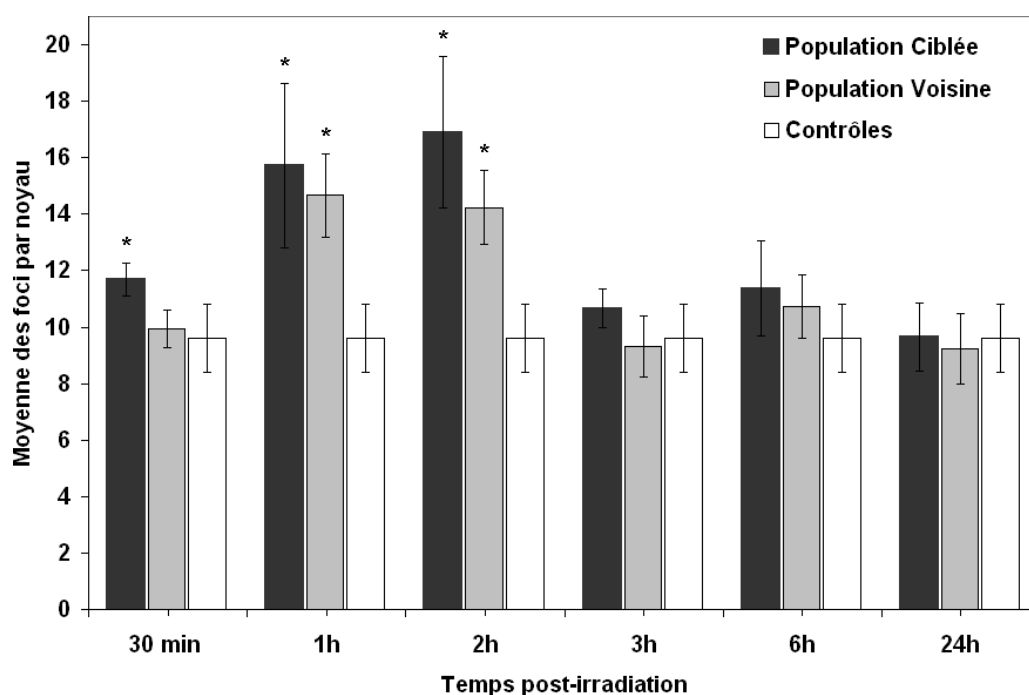


FIGURE 2.2 – Cinétique d’induction des foyers de réparation des cassures double brin de l’ADN après irradiation de 10% de la population cellulaire avec 10 particules α par noyau. (numération effectuée sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines, *, $p \leq 0,05$)

Un pic d’activation de la réparation est observé entre 1 heure et 2 heures post-irradiation. La dynamique d’apparition de ces foyers est alors du même ordre de grandeur dans les deux populations cellulaires. Passé ce temps, le nombre de foyers par noyau revient à des valeurs semblables aux contrôles.

L’induction de foyers de réparation de l’ADN est observé indépendamment dans les cellules ciblées par l’irradiation et les cellules voisines. Ceci permet de s’affranchir de l’effet de la dose et donc de mettre en évidence l’implication des signaux dit *bystander*. Les foyers induits dans la population ciblée sont directement liés à l’irradiation, par contre l’induction dans la population voisine dépend de signaux cellulaires provenant des cellules ciblées.

Cette activation des systèmes de réparation se produit dans les temps les plus courts de la cinétique, avec un pic maximal entre 1 et 2 heures post-irradiation. Passé ce temps, le nombre de foyers quantifié par noyau revient à la normale. La transduction des signaux *bystander* induisant l’activation des systèmes de réparation des CDBs dans les cellules voisines prennent donc place dans les deux heures suivant l’irradiation.

2.2 Apoptose radio-induite

Le taux d’apoptose radio-induite suite à l’irradiation par microfaisceau de particules α est quantifié *via* l’observation de la fragmentation de l’ADN mise en évidence par le protocole

TUNEL. La réponse apoptotique est observée alors que 10% de la population cellulaire est irradiée avec 10 particules α . Le taux de cellules en apoptose est quantifié à 3, 6, 24 et 48 heures post-irradiation (figure 2.3).

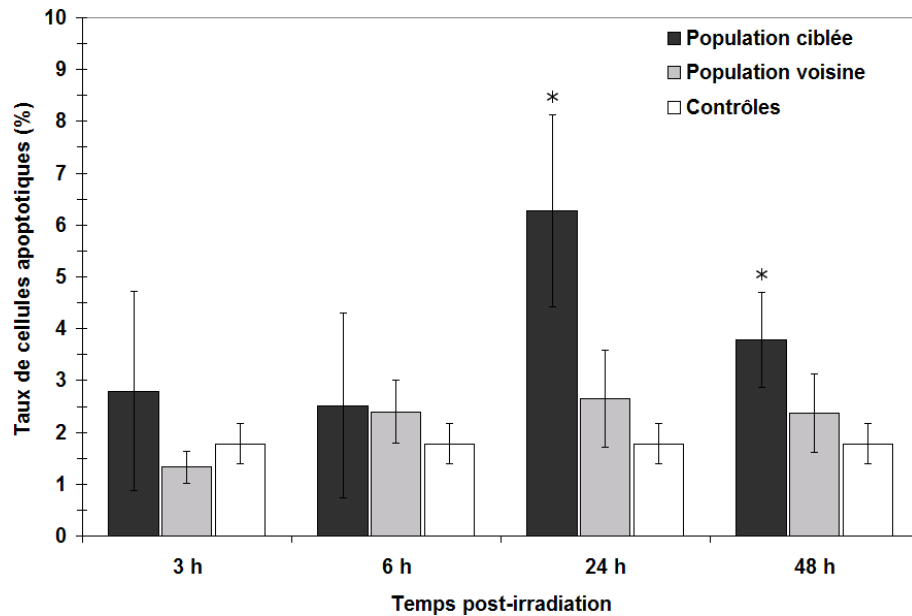


FIGURE 2.3 – Cinétique de l’apoptose radio-induite suite à l’irradiation par microfaisceaux de particules α . (numération effectuée sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines, *, $p \leq 0,05$)

Les résultats mettent en évidence un départ en apoptose radio-induite dans les cellules ciblées. Cette apoptose est transitoire : le maximum est observé 24 h post-irradiation avec $6,3\% \pm 1,8$. Passé ce temps, le taux de cellules apoptotiques dans la population ciblée diminue. Par contre, dans la population *bystander*, aucun départ en apoptose n’est observé sur cette même période de temps. Entre 0 et 48 heures après l’irradiation, la réponse *bystander* n’induit donc pas d’apoptose.

2.3 Le test des micronoyaux

Afin de caractériser l’effet génotoxique induit à long terme par les radiations, le test des micronoyaux par blocage de la cytokinèse est effectué. Ce dernier met en évidence la perte d’un fragment ou de la totalité d’un chromosome qui s’individualise sous forme de micronoyaux au cours de la division cellulaire (figure 2.4 page suivante). Les micronoyaux apparaissent majoritairement lorsque des cassures double brin ne sont pas réparées (Fimognari et al., 1997). Leur induction est appréciée par le facteur Y_{mn} ¹ reflétant le taux moyen de micronoyaux (MN) dans une cellule d’une population donnée 24 heures après irradiation. Il s’agit d’une valeur normalisée, directement représentative de la génotoxicité.

1. Yield of Micronuclei.

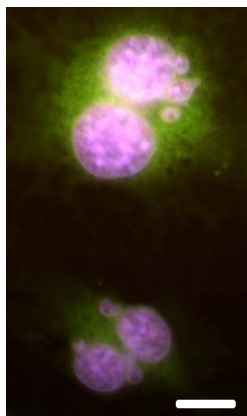


FIGURE 2.4 – Le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse permet l'identification des cellules ayant subi une division cellulaire (cellules binucléées). Cette photographie représente la survenue de micronoyaux individualisés au côté des noyaux cellulaire normaux. La barre d'échelle représente 10 μm .

L'induction de MN est observée selon deux profils : soit en fonction de la population globale, soit de façon indépendante pour les cellules irradiées et non irradiées. Cette comparaison souligne l'importance de l'observation indépendante de la réponse cellulaire.

2.3.1 Induction de micronoyaux dans la population globale

L'induction de MN est ici observée dans la population globale et ce suite à l'irradiation de 0, 10, 20, 50 ou 100% de la population cellulaire (figure 2.5).

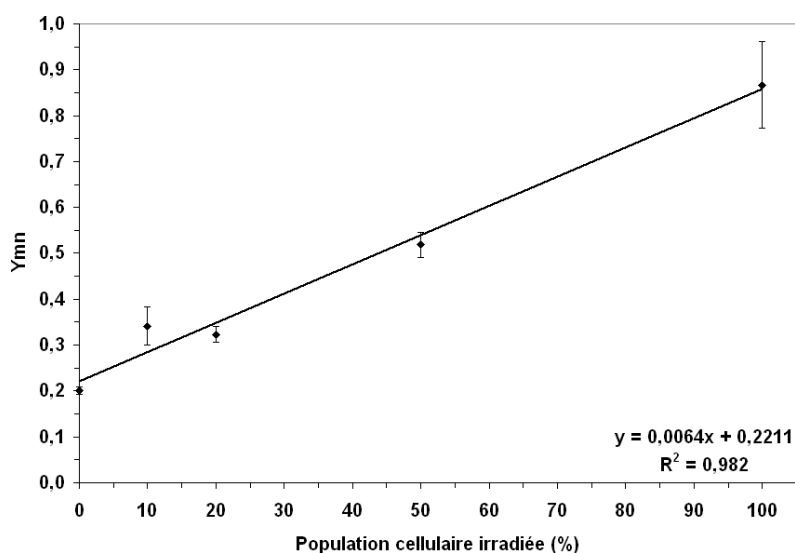


FIGURE 2.5 – Induction micronoyaux dans la population totale suite à l'irradiation de différentes fractions de la population cellulaire.(numération effectuée sur 250 cellules, *, $p \leq 0,05$)

L'étude de la génotoxicité induite dans la population globale permet de mettre en évidence l'effet de la dose. Cette relation suit dans notre cas une régression linéaire. Le taux de

dommage moyen pour une cellule augmente linéairement avec le nombre total de particules reçues.

2.3.2 Induction de micronoyaux dans la population ciblée et voisine

L'induction de micronoyaux précédemment observée dans la population globale est ici présentée différemment ; dans la population ciblée et la population *bystander* de façon indépendante. Cette observation permet de s'affranchir de l'effet de dose précédemment observé.

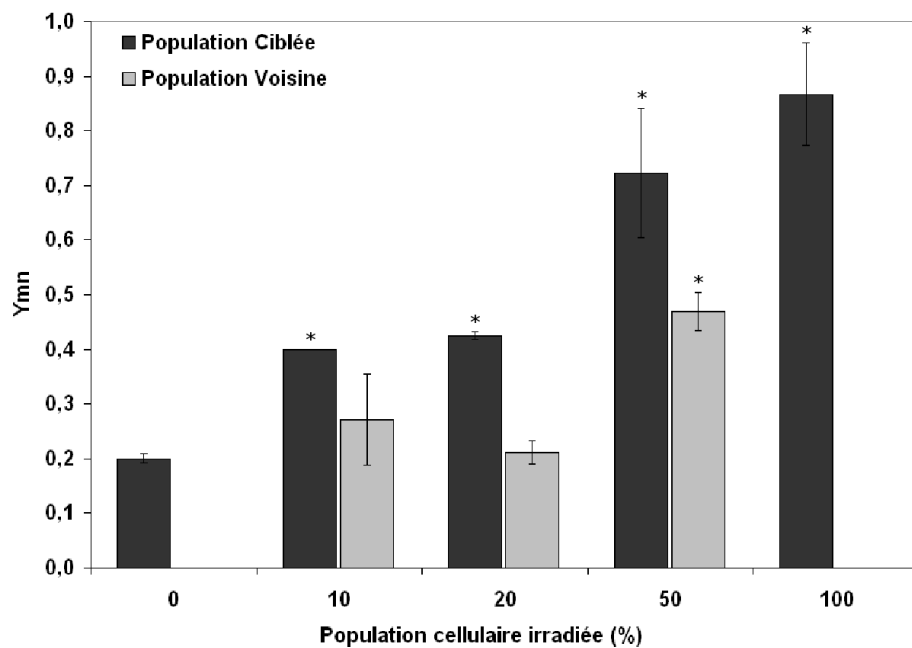


FIGURE 2.6 – Induction de micronoyaux dans la population ciblée et voisine suite à l'irradiation de différente fraction de la population cellulaire. (numération effectuée sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines, *, $p \leq 0,05$)

Les résultats présentés en figure 2.6 mettent en évidence un profil différent de l'induction de micronoyaux dans les deux populations. En effet, le profil d'augmentation du facteur Y_{mn} dans la population irradiée en fonction de la fraction de cellules ciblées n'est pas linéaire mais atteint une saturation (Y_{mn} est identique lorsque 50% ou 100% des cellules sont irradiées). Le facteur Y_{mn} mesuré dans cette population double comparativement aux contrôles (0% de cellule irradiée) lorsque 10% de population est irradiée et quadruple à 100% d'irradiation. Cette augmentation de la génotoxicité est significative dans tous les cas.

Par contre, dans la population voisine, la génotoxicité n'apparaît qu'à partir d'un certain seuil d'irradiation. L'induction de micronoyaux n'est significative que lorsque 50% de la

population est irradiée. En deça, aucune génotoxicité n'est observée.

Comme ces mesures s'affranchissent de l'effet de dose, la variation du facteur Y_{mn} est ici associée à une amplification des signaux cellulaires.

2.3.3 La catastrophe mitotique

Lors du test des micronoyaux, un second paramètre est observé ; il s'agit de l'apparition de noyaux géants, ayant un diamètre au minimum deux fois plus grand qu'un noyau classique. Ces noyaux géants, dont la figure 2.8a page 124 montre une photographie représentative, sont généralement difformes.

Caractérisation des noyaux en catastrophe mitotique

Afin de caractériser ces noyaux géants, des cultures traitées par un agent génotoxique témoin (étoposide 5 μ M) mimant l'action des rayonnements sont utilisées. Le traitement à l'étoposide permet de disposer d'un nombre plus élevé de cellules.

Ces noyaux sont dans un premier temps caractérisés en fonction du cycle cellulaire. Une mesure par cytométrie en flux (figure 2.7 page ci-contre) suivie d'un tri des cellules en fonction du cycle cellulaire permet de déterminer que ces noyaux géants sont en phase G2 (figure 2.7b page suivante), tout comme les cellules binucléées, mais ils semblent incapables de poursuivre une division nucléaire.

La numération des foyers γ H2AX et 53BP1 par immunodétection met en évidence un nombre élevé d'événements de cassures de l'ADN (cassures double brin). En effet, le nombre moyen de foyers de CDBs dans ces noyaux géants est quatre fois plus élevé que dans les noyaux contrôles (figures 2.8b et 2.8c page 124).

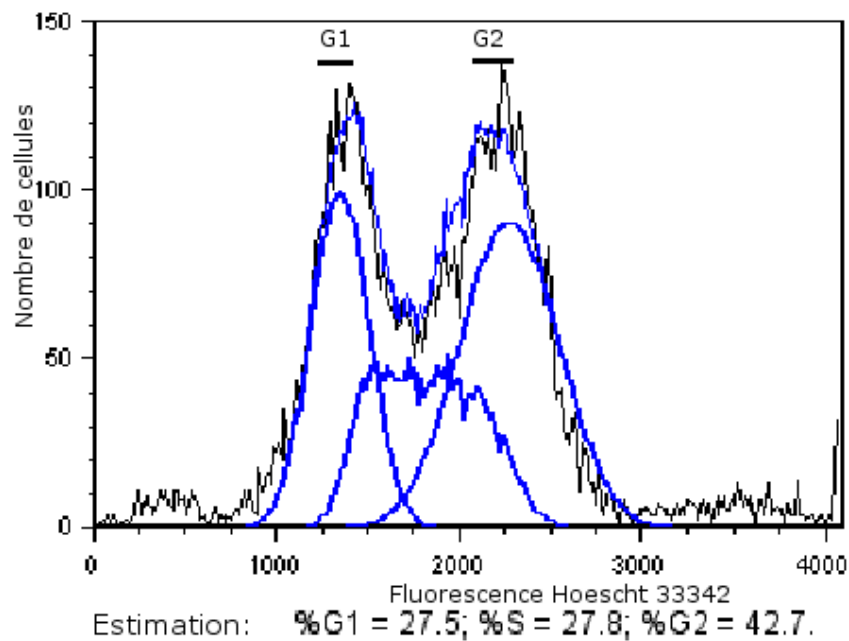
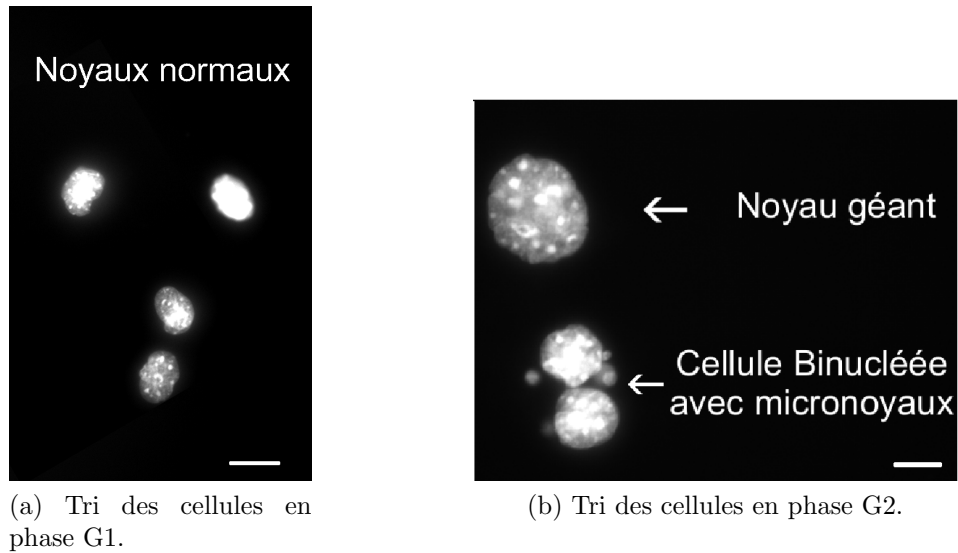
Malgré le blocage en G2 et l'abondance potentielle de cassures double brin de l'ADN, l'analyse TUNEL montre que ces cellules ne subissent pas une mort programmée en apoptose (figure 2.8e page 124). L'ensemble de cette caractérisation tend à démontrer que ces cellules à méga-noyau subissent une catastrophe mitotique, aboutissant probablement à long terme à la mort retardée.

Catastrophe mitotique et irradiation

L'induction de catastrophe mitotique est ici observée dans la population globale et ce suite à l'irradiation de 0, 10, 20, 50 ou 100% de la population cellulaire avec 10 particules α en moyenne.

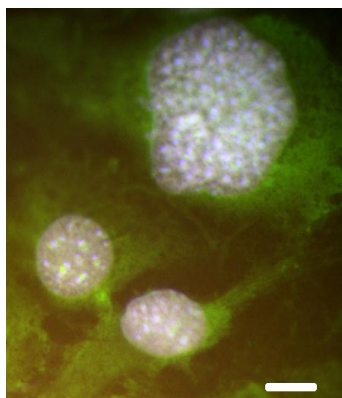
Dans les 24 heures suivant l'irradiation, la propension de cellules présentant des caractéristiques de mort mitotique est significative (figure 2.9 page 125).

En effet, dans la population ciblée, la fraction de cellules contenant ce type de noyau augmente avec la proportion de cellules ciblées. Cette augmentation est significativement

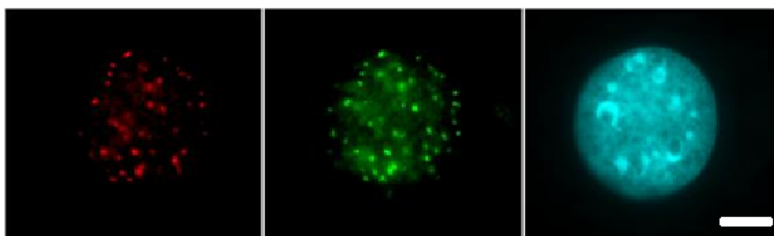


(c) Analyse du cycle cellulaire effectué sur 9311 cellules colorées au Hoechst 33342. Les sous-figures a et b représentent les noyaux obtenus suite au tri cellulaire en phase G1 et G2.

FIGURE 2.7 – Cytométrie en flux pour l'étude du cycle cellulaire. Les cultures sur lesquelles ont été réalisées les tests présentés ci-dessus ont été traitées à l'étoposide 5 μ M. La barre d'échelle correspond à 10 μ m.



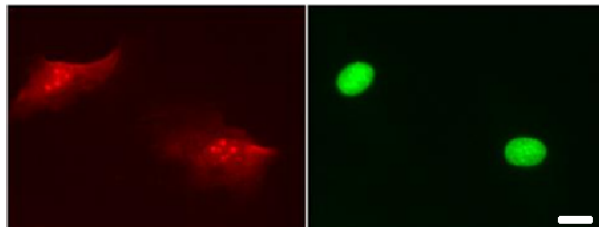
(a) Photographie représentative d'un noyau géant.



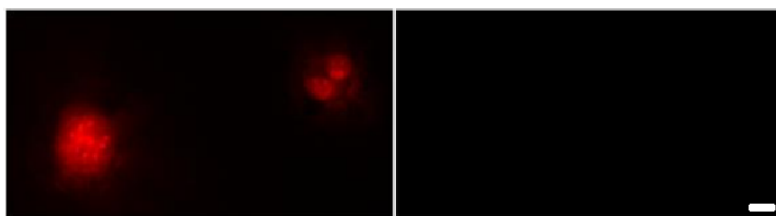
(b) Exemple de mise en évidence de cassures double brin par marquage du γ H2AX (vert) et 53BP1 (rouge) dans un noyau géant MC3T3. Le marquage du noyau est réalisé par coloration Hoechst 33342 (bleu).

	Noyaux géants	Noyaux normaux
Nombre de foyers	$23,8 \pm 9,4$	$8,3 \pm 0,8$

(c) Numération des foyers de réparation des CDBs dans les noyaux géants. Mesures effectuée sur 40 noyaux.



(d) Contrôle positif (DNase I) pour la détection de l'apoptose par protocole TUNEL. Les noyaux apoptotiques sont verts. Le marquage des noyaux est réalisé par coloration à l'iodure de propidium (rouge).



(e) Protocole TUNEL effectué sur noyau géant. Ces noyaux sont négatifs pour l'apoptose.

FIGURE 2.8 – Caractérisation des noyaux géants. Les cultures sur lesquelles ont été réalisées les tests présentés ci-dessus ont été traitées à l'étoposide $5 \mu\text{M}$. La barre d'échelle correspond à $10 \mu\text{m}$.

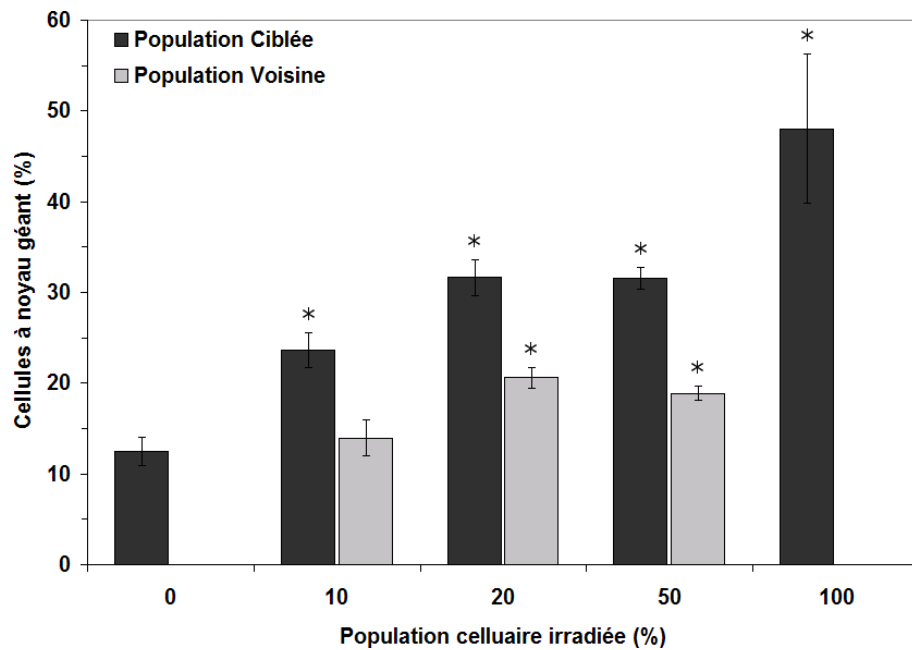


FIGURE 2.9 – Évaluation de la proportion de cellules présentant des caractéristiques de mort mitotique suite à l’irradiation par microfaisceau d’ions de différentes fractions de la population cellulaire MC3T3 globale. (numération effectuée sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines, *, $p \leq 0,05$)

différente du contrôle dans chaque cas. Ces méga-noyaux apparaissent aussi dans la population voisine, mais dans une moindre mesure. Dans les cellules voisines, cette augmentation est significative lorsque 20 et 50% des cellules sont irradiées.

2.4 Conclusions

La réponse à l'irradiation nucléaire de la population cellulaire ciblée et voisine est ici mesurée selon trois critères : l'induction de micronoyaux, l'induction de cassures double brin, ainsi que la mort cellulaire.

Ces travaux permettent la caractérisation de la réponse cellulaire suite à l'irradiation ciblée mettant ainsi en évidence l'existence d'un effet de voisinage pour le type cellulaire MC3T3-E1.

Suite à une irradiation avec 10 particules α en moyenne par noyau, la réponse de la **population ciblée** se caractérise par une augmentation des foyers de CDBs au cours des deux premières heures, s'accompagnant 24 heures après irradiation d'une forte induction de micronoyaux et d'un taux non négligeable de mort cellulaire apoptotique et de catastrophe mitotique.

Parallèlement à cela, lorsque 10% de la population cellulaire est irradiée, l'**effet de voisinage** induit des conséquences cellulaires en peu de temps. En effet, dans la population voisine l'immunodétection de γ H2AX et 53BP1 montre un pic de recrutement des systèmes de réparation des cassures double brin dans la même gamme de temps que la population ciblée (pic d'activation entre 1 et 2 heures après irradiation). Par contre, dans cette population bystander, les dommages à l'ADN potentiellement induits sont incapables de conduire pas à plus long terme à une génotoxicité détectable avec le test des micronoyaux ou même à la mort cellulaire (catastrophe mitotique ou apoptose). L'effet de voisinage existe donc, mais il n'est pas assez important pour provoquer, dans la mesure des techniques utilisées ici, des conséquences biologiques moins importantes que dans les cellules ciblées 24 heures après irradiation.

Autrement, lorsque **différentes proportions** de la population cellulaire sont irradiées, les résultats exposés tendent à montrer que les signaux *bystander* issus des cellules ciblées participent à une amplification de la réponse cellulaire, que la cellule soit ciblée ou non par l'irradiation. L'induction des micronoyaux et le taux de cellules présentant des caractéristiques de mort mitotique démontrent ce phénomène. Cette amplification n'est pas due à un effet de dose car l'identification des populations cellulaires permet de s'en affranchir. Cependant, l'amplification de la réponse semble s'incrémenter sur l'ensemble des signaux émis par les cellules ciblées ; plus la fraction cellulaire irradiée augmente, plus le taux de signaux émis augmente, plus les conséquences cellulaires sont amplifiées.

Cette amplification est observée à la fois dans la population ciblée et voisine. Ceci indique que toute cellule, ciblée ou non, peut recevoir les signaux émis suite à l'irradiation et peut y répondre. Néanmoins, les cellules ciblées semblent montrer une sensibilité plus importante à ces signaux que la population voisine, car l'induction de micronoyaux comme l'induction de la mort mitotique est significative dès 10% de cellules irradiées et ce en proportion plus importante que dans la population voisine.

3

Métabolisme oxydatif et signalisation membranaire

« *La découverte est un plaisir aussi subtil et intéressant que la connaissance.* »
Jacques Lamarche

Sommaire

3.1	Dynamique du métabolisme oxydatif suite à l'irradiation ciblée	129
3.1.1	Génération d'espèces radicalaires suite à l'irradiation	129
3.1.2	Défense cellulaire : le glutathion réduit	132
3.1.3	Conclusions	133
3.2	Implication de la signalisation membranaire	135
3.2.1	Signalisation de la membrane et génération d'EROs	135
3.2.2	Signalisation membranaire et induction des foyers de réparation des CDBs	136
3.2.3	Impact de la signalisation membranaire sur l'induction de micronoyaux	137
3.2.4	Impact de la signalisation membranaire sur l'induction de la mort mitotique	137
3.2.5	Conclusions	140

LES RADICAUX LIBRES sont l'une des principales causes de toxicité dans les cellules soumises à une irradiation. Depuis la découverte des effets non ciblés, de nombreuses études impliquent plus particulièrement les espèces réactives de l'oxygène dans l'effet de voisinage (chapitre 2.4 page 41). La caractérisation de la réponse des cellules MC3T3 met en évidence un effet de voisinage suite à l'irradiation de 10% de la population cellulaire avec 10 particules α . Ce phénomène se traduit par l'induction de CDBs dans les deux premières heures suivant l'irradiation.

Ce chapitre propose l'étude de la génération de radicaux libres dans les mêmes conditions expérimentales afin d'établir une comparaison temporelle des événements cellulaires observés. Dans un second temps, le rôle de la membrane cytoplasmique dans la réponse des deux populations cellulaires sera considéré.

3.1 Dynamique du métabolisme oxydatif suite à l'irradiation ciblée

L'objectif est d'évaluer la génération d'espèces radicalaires dans les cellules ciblées et voisines suite à l'irradiation de 10% de la population cellulaire avec 10 particules α par noyau. Pour cela, trois sondes fluorescentes nommées CM-H2DCFDA¹, DHR123² et CMAC³, permettant la détection directe d'espèces radicalaires ou de l'activité antioxydante ont été utilisées. Les spécificités d'utilisation de chacune de ces sondes sont développées section 6 page 86.

3.1.1 Génération d'espèces radicalaires suite à l'irradiation

Les sondes CM-H2DCFDA et DHR123 fluorescent suite à la détection d'espèces radicalaires. La première se localise dans l'ensemble de la cellule, ce qui permet une évaluation du stress oxydant global. La seconde permet quant à elle une détection des radicaux oxygénés spécifiquement localisés aux mitochondries.

La production de radicaux libres dans les cellules

CM-H2DCFDA est la sonde fluorescente la plus référencée pour la détection d'espèces radicalaires (Bartosz, 2006; Myhre et al., 2003). Préalablement utilisée pour la détection spécifique de H_2O_2 ou $HO\cdot$, cette sonde permet en réalité la détection d'une large gamme d'espèces radicalaires issues de l'oxygène telles que le radical perhydroxyle $HO_2\cdot$, le radical hydroxyle $HO\cdot$, le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ ou les dérivés alkoxyles ($RO\cdot$) ou encore celles issues de l'azote telle que le peroxyne (ONOO⁻), (Bonini et al., 2006; LeBel et al., 1992).

1. 5-(et-6)-chloromethyl-2'7'-dichlorodihydro-fluoresceine diacetate acetyl ester

2. Dihydrorhodamine 123

3. 7-amino-4-chloromethylcoumarine

Son utilisation pour l'évaluation du stress oxydant intracellulaire en microscopie de fluorescence requiert certaines précautions. En effet, CM-H2DCFDA est une sonde extrêmement photo-oxydable, de plus sa stabilité chimique n'est pas garantie (Bonini et al., 2006; Tomizawa et al., 2005).

La méthodologie adoptée pour la détection des radicaux consiste à évaluer le taux de sonde oxydée ou « allumée » au moment de l'observation (la limitation de l'illumination à 150 ms permettant de limiter la photo-oxydation) par rapport au taux total de sonde incorporée dans chaque cellule. Ce taux total de sonde incorporée est mesuré après photo-oxydation totale de la sonde et est considéré comme égal à 1.

Les mesures sont réalisées cellule à cellule. Les résultats présentés figure 3.1, représentent le taux moyen de sonde oxydée par les espèces radicalaires pour une cellule de la population ciblée ou voisine. Ceci permet donc une évaluation du stress oxydant intracellulaire suite à l'irradiation.

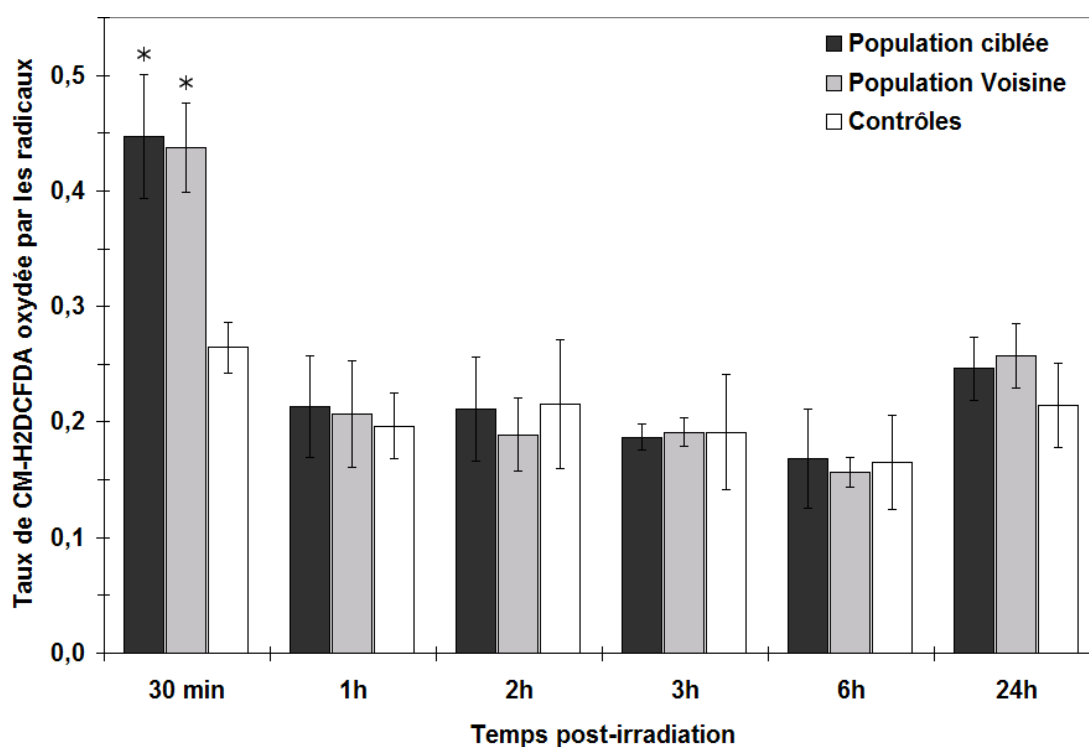


FIGURE 3.1 – Évaluation du stress oxydant global suite à l'irradiation de 10% de la population cellulaire avec 10 particules α par noyau (mesures effectuées sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines, *, $p \leq 0,01$).

Les mesures réalisées avec la sonde CM-H2DCFDA mettent en évidence un stress oxydant dans la population ciblée et voisine au temps le plus court de la cinétique, soit 30 minutes après irradiation. Ce stress est relativement important car il correspond dans les deux cas à l'oxydation de presque 50% du taux CM-H2DCFDA incorporées dans les cellules.

Néanmoins, ce stress est transitoire car au delà de 30 minutes, aucune consommation de la sonde n'est observée, comparativement aux contrôles.

La production de radicaux libres dans les mitochondries

La génération d'EROs dans les mitochondries est mise en évidence par l'utilisation de la sonde DHR123. Cette sonde diffuse passivement à travers la membrane plasmique et se localise spécifiquement dans les mitochondries. Une fois dans les mitochondries et en présence de H_2O_2 ou $O_2^{\cdot-}$, la sonde s'oxyde en rhodamine et devient fluorescente. La DHR123 permet ainsi une évaluation du stress oxydant mitochondrial.

Les mesures de fluorescence de la DHR123 sont effectuées cellule à cellule. La variation de la fluorescence moyenne pour une cellule de la population ciblée ou voisine est comparée aux contrôles, ces derniers étant considérés comme égal à 1. Les mesures réalisées suite à l'irradiation sont présentées en figure 3.2.

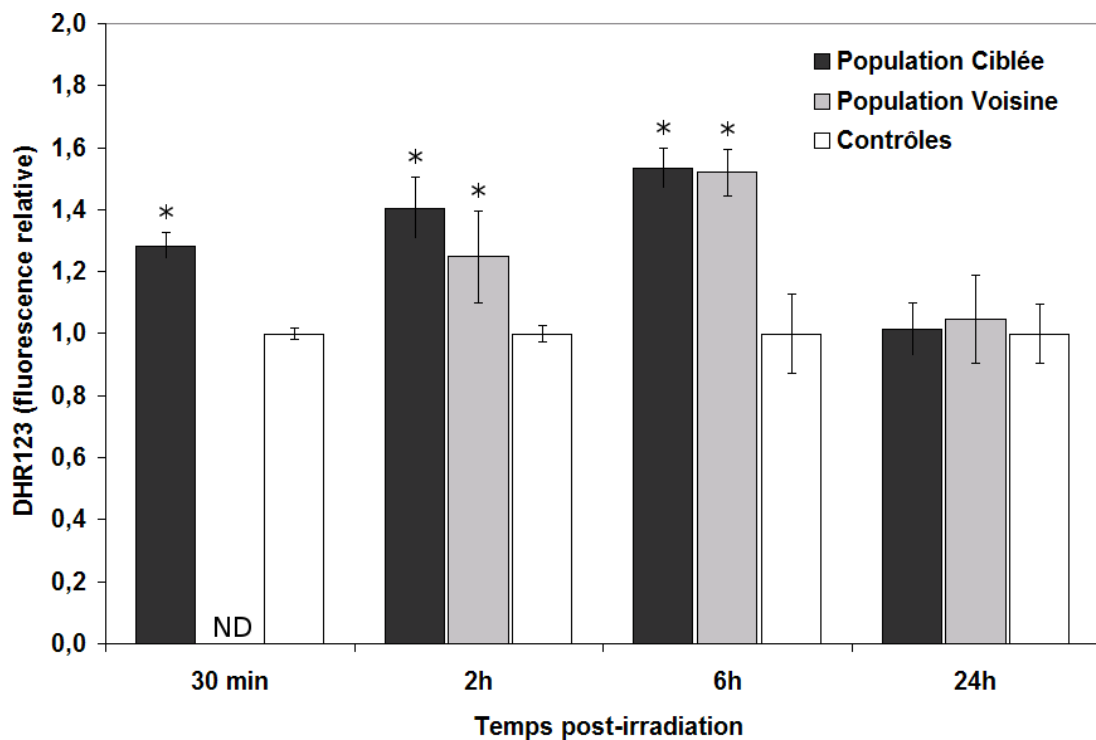


FIGURE 3.2 – Évaluation du stress oxydant mitochondrial suite à l'irradiation de 10% de la population cellulaire avec 10 particules α par noyau. ND (non déterminée) signifie que la mesure pour ce point n'est pas déterminée. (mesures effectuées sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines, *, $p \leq 0,01$)

Les résultats montrent une production croissante d'espèces radicalaires dans la population ciblée au cours des 6 premières heures suivant l'irradiation. Ensuite, 24 heures après

l'irradiation, la génération d'EROs revient au niveau basal de production dans les mitochondries.

Dans la population voisine, une augmentation du stress mitochondrial est aussi mesurée entre 2 et 6 heures après irradiation. Le point de cinétique à 30 minutes n'a pas pu être déterminé. Les mesures réalisées 24 heures après irradiation montrent un retour à la normale de l'état de stress mitochondrial.

Que ce soit dans la population ciblée ou voisine, la génération d'EROs mitochondriales atteint un maximum 6 heures après l'irradiation. Ce maximum correspond à une augmentation de près de 60% de production basale d'espèces radicalaires.

3.1.2 Défense cellulaire : le glutathion réduit

L'ensemble des dommages radicalaires semble pouvoir être limité, tout au moins en partie, par l'action de molécules dites antioxydantes. Celles-ci empêchent les EROs d'atteindre leurs cibles biologiques, d'où leur fonction de protecteur chimique. Un bon antioxydant est un bon « capteur » de radicaux libres. Toutefois, cette condition est insuffisante ; il faut en outre que l'antioxydant soit régénéré *in vivo* de manière à jouer plusieurs fois son rôle. Parmi les antioxydants non enzymatiques se trouvent les thiols (fonction SH) dont certains sont synthétisés *in vivo*, comme le glutathion (symbolisé ici par GSH) (pour revue, Gardès-Albert, 2003).

Le glutathion est un tripeptide dont la concentration intracellulaire est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} mol.L⁻¹ (Halliwell B., 1999). La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant, c'est-à-dire de réducteur (donneur d'électron ou d'atome H), qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles. Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux centrés sur le carbone R[•]. En effet dans ce cas, un phénomène de « réparation » des radicaux R[•] en RH se produit.

La sonde CMAC permet de détecter avec une forte spécificité le glutathion réduit intracellulaire. Toute variation de la fluorescence permet donc d'apprécier la consommation de GSH consécutive à un stress oxydant. Le taux basal de glutathion réduit est évalué dans les contrôles et est considéré comme équivalent à 100%. Afin d'évaluer la consommation du glutathion réduit, toute variation de fluorescence est traduite en pourcentage par rapport aux contrôles.

La figure 3.3 page suivante présente les résultats obtenus dans les deux populations cellulaires suite à l'irradiation. Dans la population ciblée, une consommation importante, de l'ordre de 30% du stock de glutathion réduit, est observée dans les 30 minutes suivant l'irradiation. Le stock de GSH est encore largement entamé ($\approx 15\%$) 2 heures plus tard. À partir de 3 heures post-irradiation le taux de GSH dans la population ciblée est équivalent aux contrôles.

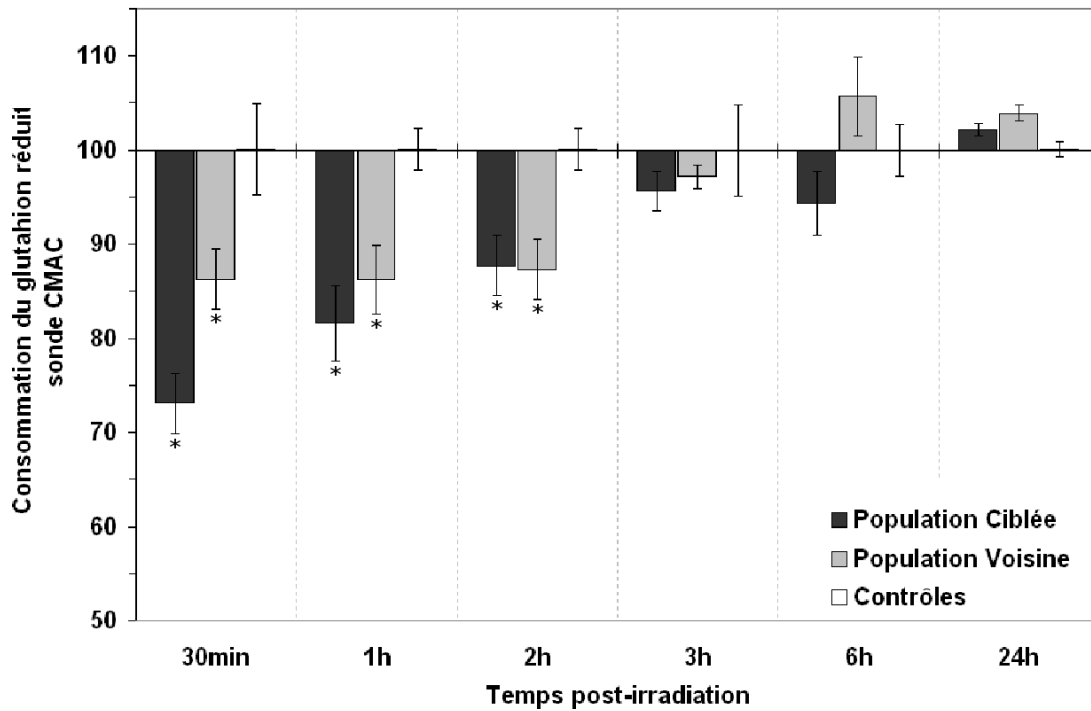


FIGURE 3.3 – Évaluation de la consommation du glutathion réduit intracellulaire suite à l'irradiation ciblée de cellules MC3T3-E1.(mesures effectuées sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines, *, $p \leq 0,01$)

Dans la population voisine une consommation du GSH est mise en évidence dans la même gamme de temps que pour la population ciblée, c'est-à-dire dans les deux premières heures suivant l'irradiation. Cependant cette consommation est moindre : elle n'excède pas 15% du stock basal. Les variations observées 6 et 24 heures après irradiation dans la population voisine ne sont pas significatives.

3.1.3 Conclusions

La détection *in situ* des radicaux libres et du GSH intracellulaire suite à l'irradiation mettent en évidence l'existence d'un stress oxydant dans la population cellulaire ciblée ainsi que dans la population voisine. Ces observations démontrent plus particulièrement l'existence de deux événements distincts de production d'espèces radicalaires ; le premier événement reflétant un stress généralisé à l'ensemble des cellules se produit dans les temps les plus courts de la cinétique et le second événement mitochondrial est persistant jusque 6 heures après irradiation.

Le stress oxydant généralisé dans les cellules 30 minutes après irradiation est détecté *in situ* par la sonde CM-H2DCFDA dans les deux populations cellulaires. Cette génération d'EROs s'accompagne de l'activation, au moins en partie, des défenses antioxydantes mesurée *via* la consommation de glutathion réduit. Cette consommation du GSH constatée jusque 2 heures après irradiation est certainement due à la détoxication de radicaux de

type R \cdot et au temps de renouvellement des stocks de glutathion réduit après un stress oxydant important.

Sur la base d'une comparaison temporelle des événements cellulaires, une coïncidence peut être relevée entre la génération de radicaux libres et l'activation des foyers de réparation des CDBs de l'ADN. En effet, ce premier événement intense de production d'ERO intervient juste avant l'activation des foyers. De plus, la détoxification par le glutathion est concomitante avec le pic maximum d'activation des systèmes de réparation.

Le second événement de production d'EROs est lié à l'activité mitochondriale. Dans les premiers temps suivant l'irradiation, la production d'EROs par les mitochondries détectée par DHR123 participe probablement au stress général, bien qu'elle ne soit pas détectée lors des mesures réalisées avec CM-H2DCFDA ou CMAC. En outre, l'augmentation de la production d'EROs mitochondriales persiste au moins jusque 6 heures après l'irradiation dans les deux populations cellulaires.

La production d'EROs par les mitochondries est décrite comme l'un des premiers événements cellulaires conduisant à l'apoptose. La comparaison des cinétiques de génération de EROs par les mitochondries et de départ en apoptose 24 heures après irradiation indique une cohérence des événements dans la population ciblée. Par contre, la population voisine ne subit pas d'apoptose radio-induite. Les mitochondries sont productrices d'EROs dans les cellules voisines et jouent donc probablement un rôle dans l'effet de voisinage.

La présence de radicaux libres 30 minutes après irradiation ou même la génération d'EROs par les mitochondries se produisent dans des gammes de temps relativement longues par rapport à la durée de vie d'un radical (de l'ordre de 10^{-9} seconde). La présence de radicaux ne peut donc pas être imputée à l'effet indirect des radiations mais semble plutôt indiquer l'implication d'une signalisation cellulaire conduisant à leur production que ce soit dans la population ciblée ou voisine. La section suivante porte plus particulièrement sur l'implication de la signalisation issue de la membrane plasmique.

3.2 Implication de la signalisation membranaire

Le rôle de la signalisation membranaire dans la réponse cellulaire suite à l'irradiation est ici exploré de manière indirecte. En effet afin d'inhiber un spectre large de signaux issus de la membrane plasmique, les cultures cellulaires sont cultivées temporairement en présence d'un agent dissociant les radeaux de lipides, la filipine. La filipine dissocie principalement les radeaux lipidiques contenant du cholestérol (Loura et al. (2001); Cremesti et al. (2001)). Ces radeaux participent au maintien de la conformation de récepteurs ou protéines transmembranaires et à la transductions de signaux (par phosphorylation) de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Simons and Ikonen, 1997; Hanzal-Bayer and Hancock, 2007; Golub et al., 2004).

3.2.1 Signalisation de la membrane et génération d'EROs

Afin de déterminer l'implication potentielle de la signalisation membranaire dans la génération de radicaux, la réponse cellulaire suite à l'irradiation de 10% de la population cellulaire avec 10 particules α est étudiée en présence et en absence de filipine.

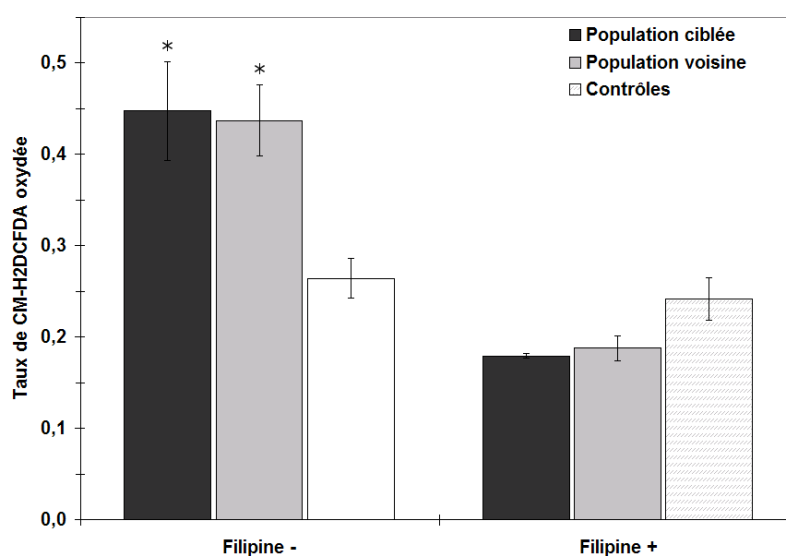


FIGURE 3.4 – Évaluation du stress oxydant global par la sonde CM-H2DCFDA 30 minutes après irradiation de 10% de la population cellulaire avec 10 particules α par noyau avec ou sans traitement avec la filipine (mesures effectuées sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines, *, $P \leq 0,01$).

La génération de radicaux est évaluée par utilisation de la sonde CM-H2DCFDA 30 minutes après irradiation (figure 3.4). Le traitement des cultures avec la filipine n'influe pas le niveau basal d'EROs intracellulaire comparativement aux contrôles non exposés.

Le traitement avec la filipine joue par contre un rôle sur la génération de radicaux suite à l'irradiation. En effet, dans ce cas les taux de sondes oxydées dans les populations ciblée

et voisine sont équivalents aux contrôles. Ce traitement inhibe le premier évènement de production de radicaux produisant un stress oxydant global dans les 30 minutes suivant l'irradiation.

Comme cet évènement de génération de radicaux est potentiellement impliqué dans l'induction de cassures double brin de l'ADN, l'influence de la filipine sur l'induction de foyers de réparation est étudiée dans la section suivante.

3.2.2 Signalisation membranaire et induction des foyers de réparation des CDBs

L'induction des foyers de réparation des CDBs est mise en évidence par immunodétection de γ H2AX et 53BP1. La caractérisation de la réponse cellulaire précédemment établie indiquait un pic d'activation de la réparation entre 1 heure et 2 heures post-irradiation pour les populations ciblée et voisine. L'influence de la filipine est étudiée uniquement pour le point de cinétique correspondant à ce pic d'activation, soit 2 heures post-irradiation.

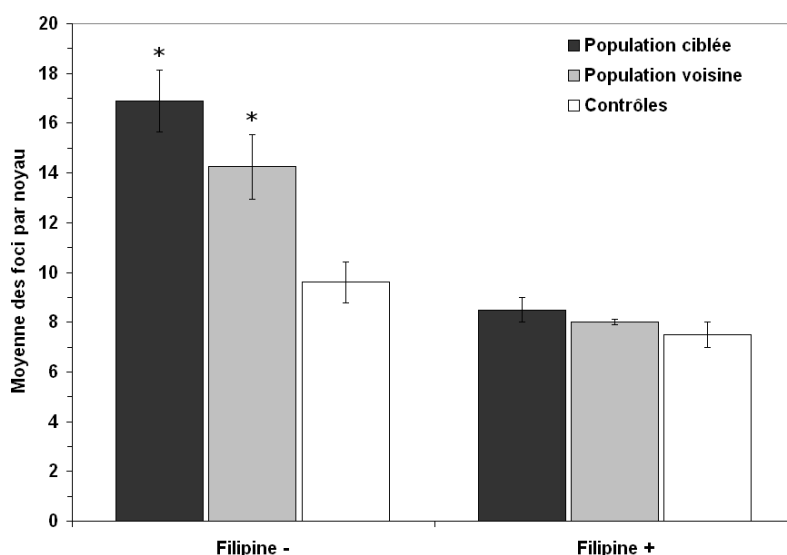


FIGURE 3.5 – Induction des foyers des cassures double brin de l'ADN après irradiation de 10% de la population cellulaire avec 10 paticules α par noyau avec ou sans traitement avec la filipine. (mesures effectuées sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines, *, $p \leq 0,05$)

Les foyers γ H2AX et 53BP1 sont utilisés pour déterminer l'emplacement de CDBs. Ces foyers sont dénombrés noyau par noyau pour chaque population. La figure 3.5 présente la moyenne des foyers de CDBs pour un noyau d'une population donnée.

Le traitement des cultures avec la filipine n'influe pas le nombre moyen de foyers observés par noyau dans les cultures contrôles. Par contre, le traitement avec la filipine inhibe l'induction des foyers de réparation suite à l'irradiation. En effet, le nombre moyen de foyers

dans les populations ciblée et voisine est semblable aux contrôles. La signalisation membranaire semble donc contribuer à une cascade d'évènements conduisant à la génération de cassures double brin de l'ADN suite à l'irradiation dans les cellules voisines mais aussi dans les cellules ciblées. L'induction de CBDs dans la population ciblée est donc partiellement liée à l'effet direct des rayonnements ionisants sur l'ADN, et semble dépendre en grande partie de la signalisation issue de la membrane.

3.2.3 Impact de la signalisation membranaire sur l'induction de micronoyaux

Afin d'étudier l'impact de la signalisation membranaire sur la génotoxicité induite à long terme, l'induction de MN est observée 24 heures après irradiation dans les populations ciblée et *bystander* traitées avec la filipine. L'induction de MN mesurée dans ce cas est comparée aux résultats précédemment obtenues lors de la caractérisation de la réponse cellulaire.

Les figures 3.6a et 3.6b page suivante présentent les résultats observés pour les populations ciblée et voisine respectivement. Le traitement des cultures avec la filipine n'influence pas l'induction de MN dans les contrôles (0% de cellules irradiées). Par contre le traitement à la filipine diminue fortement, sans pour autant l'inhiber totalement, l'induction de micronoyaux après irradiation.

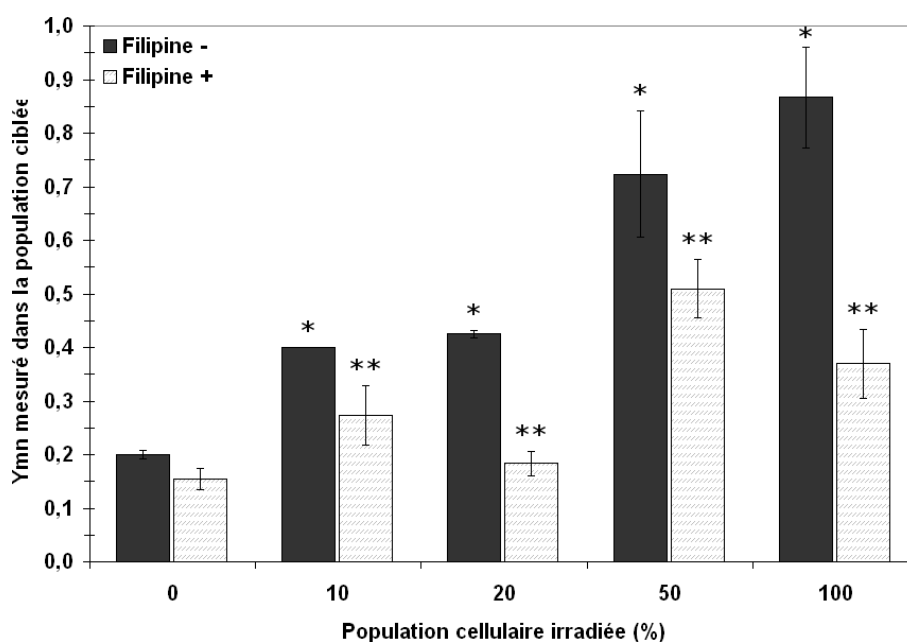
Dans la population voisine, l'effet de voisinage (précédemment mis en évidence lorsque 50% de la population est irradiée) est diminué de $\approx 1/3$ lorsque les cultures ont été exposées à la filipine.

L'effet de la filipine dans la population ciblée est encore plus prononcé. En effet, le facteur Ymn diminue de $\approx 1/3$ (lorsque 10% et 50% de la population sont irradiés) à $\approx 1/2$ (lorsque 20% et 100% de la population sont irradiés). Bien que l'effet d'atténuation de l'induction de MN soit conséquent, aucune relation de proportionnalité ne peut être établie.

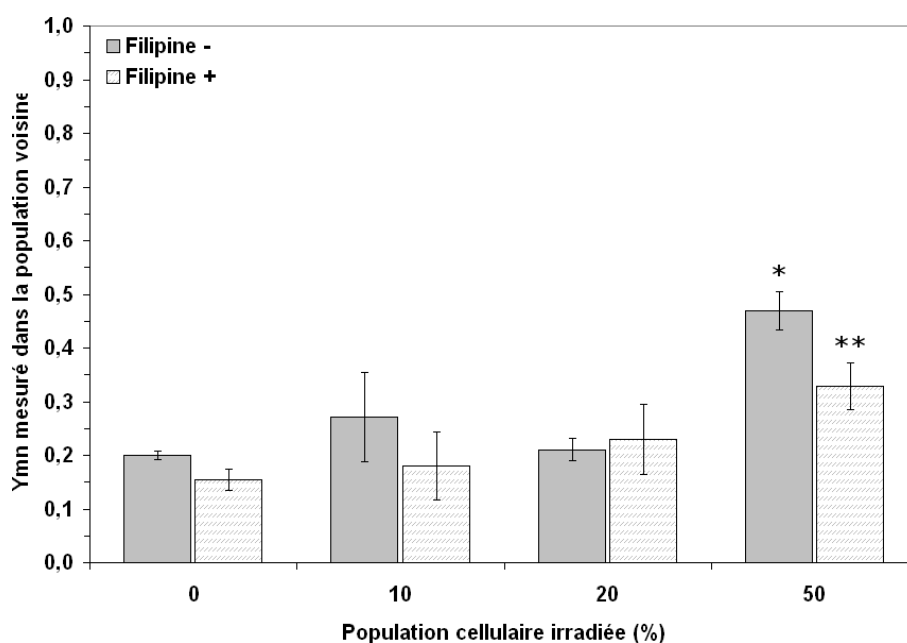
3.2.4 Impact de la signalisation membranaire sur l'induction de la mort mitotique

Dans les mêmes conditions expérimentales, l'effet du traitement avec la filipine est observé sur l'induction de la mort mitotique à travers la quantification des cellules présentant un noyau géant après irradiation. Comme précédemment, cette quantification est comparée aux résultats obtenus lors de la caractérisation de la réponse cellulaire.

Lorsque les cultures ont été traitées à la filipine, la proportion de cellules ciblées présentant un noyau géant est fortement diminuée (figure 3.7a page 139). L'induction de la mort mitotique est abolie dans le cas d'une irradiation de 10% de la population cellulaire. Dans les autres cas d'irradiation, le taux de cellules à noyau géant se stabilise autour de 20%.

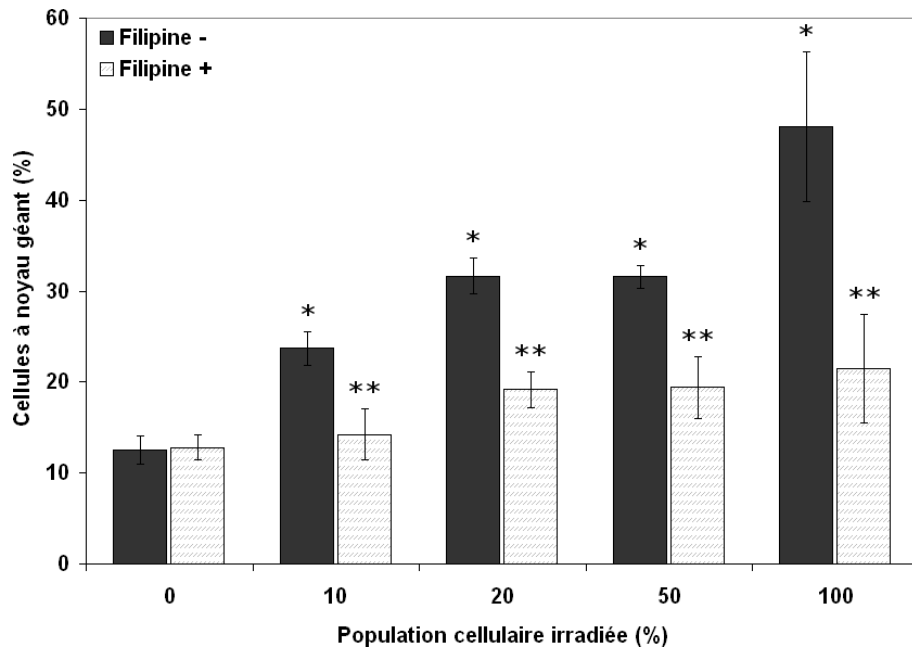


(a) Induction micronoyaux dans la population ciblée suite à l'irradiation de différentes fractions de la population cellulaire avec 10 α par noyau avec ou sans traitement des cultures à la filipine.

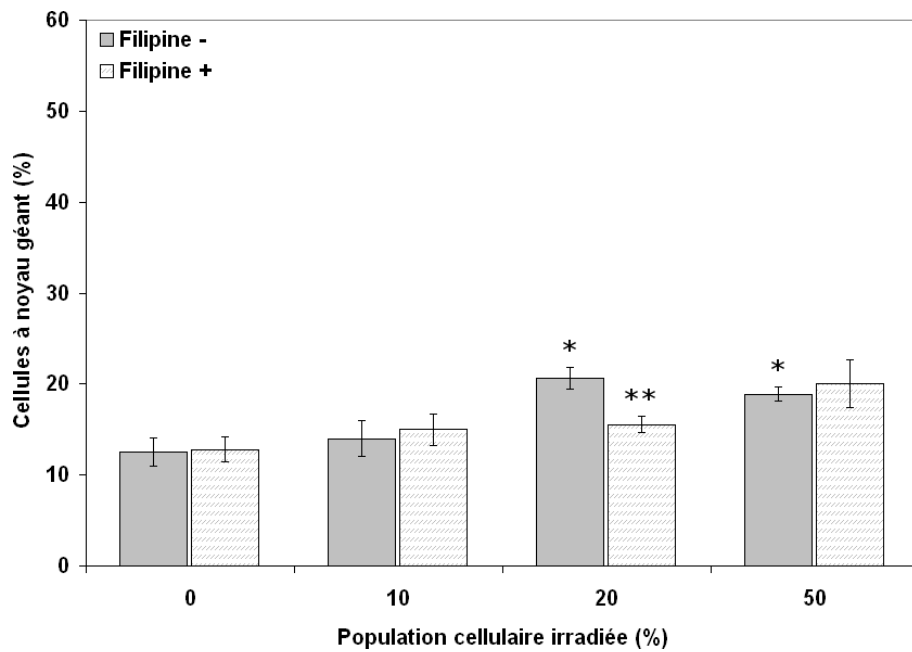


(b) Induction micronoyaux dans la population voisine suite à l'irradiation de différentes fractions de la population cellulaire avec 10 α par noyau avec ou sans traitement des cultures à la filipine.

FIGURE 3.6 – Influence du traitement des culture MC3T3 à la filipine sur l'induction de micronoyaux après irradiation par microfaisceau. (*, $p \leq 0,05$ est évalué par rapport aux contrôles, **, $p \leq 0,05$ est évalué par rapport aux mesures effectuées sans traitement à la filipine et dans les mêmes conditions expérimentales. Mesures effectuées sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines.)



(a) Évaluation de la proportion de cellules ciblées présentant des caractéristiques de mort mitotique avec ou sans traitement des cultures à la filipine.



(b) Évaluation de la proportion de cellules voisines présentant des caractéristiques de mort mitotique avec ou sans traitement des cultures à la filipine.

FIGURE 3.7 – Influence du traitement des cultures cellulaire MC3T3 à la filipine sur l'induction de caractéristiques de mort mitotique après irradiation par microfaisceau avec 10 particules α par noyau (*, $p \leq 0,05$ est évalué par rapport aux contrôles, **, $p \leq 0,05$ est évalué par rapport aux mesures effectuées sans traitement à la filipine et dans les mêmes conditions expérimentales. Mesures effectuées sur 90 cellules irradiées et 140 cellules voisines.)

L'effet sur la population voisine est beaucoup moins prononcé (figure 3.7b page précédente). En absence de traitement avec la filipine, l'induction de cellules à noyau géant est significative lorsque 20% et 50% de la population cellulaire sont irradiées. Le traitement des cultures à la filipine, n'influe que l'induction observée lorsque 20% de la population cellulaire est irradiée.

3.2.5 Conclusions

La signalisation issue de la membrane plasmique joue un rôle important dans la réponse cellulaire suite à l'irradiation. Le traitement des cultures avec la filipine, déstructurant les radeaux de lipides et par conséquent la majorité de la signalisation membranaire, induit une diminution importante des conséquences biologiques observées dans le cadre de cette étude. Les conséquences à court terme telles que la génération de radicaux dans la première demie-heure suivant l'irradiation, de même que l'induction des CDBs sont annihilés par le traitement à la filipine. Ceci s'observe dans les deux populations cellulaires. La signalisation membranaire influe donc fortement sur la réponse des cellules ciblées et joue probablement un rôle dans l'effet de radiosensibilisation de ces cellules. La réponse des cellules ciblées étant modifiée par le traitement à la filipine, l'effet de la signalisation membranaire dans l'effet de voisinage ne peut pas être évalué par cette observation seule.

Les conséquences à plus long terme concernant les dommages à l'ADN ou la catastrophe mitotique sont aussi fortement minimisées par la filipine, sans pour autant être totalement abrogées. La filipine influe fortement sur la réponse des cellules ciblées et, dans une moindre mesure, celle des cellules voisines. Les conséquences à long terme observées dans les cellules ciblées en présence de filipine sont dans ce cas probablement dépendantes de l'interaction des rayonnements avec la matière. Les signaux issus de la membrane plasmique semblent jouer un rôle conséquent dans l'amplification de la réponse cellulaire préalablement mis en évidence dans les cellules ciblées. Par contre, la réponse des cellules *bystander* implique aussi en partie la signalisation membranaire, mais dépend pour une autre part d'une voie de signalisation que celles inhibées par ce traitement.

Quatrième partie

Conclusions et discussion

Micro-irradiation et réponse cellulaire : les cellules MC3T3-E1

Sommaire

1.1	Cinétiques des évènements cellulaires suite à l'irradiation	145
1.1.1	La réponse des cellules voisines	145
1.1.2	Réponse des cellules ciblées et voisines : le bilan	146
1.2	L'implication des EROs dans l'effet de voisinage	146
1.3	L'effet de voisinage est observé dans les cellules <i>bystander</i> et les cellules ciblées	149
1.4	Implication de l'effet de voisinage dans les cellules ciblées	151
1.5	La notion de distance et l'effet de voisinage	152
1.6	Conclusion : l'effet de voisinage, une amplification de la réponse cellulaire	153

LA RÉPONSE CELLULAIRE est ici étudiée avec une méthodologie originale basée sur l'analyse de la réponse **cellule à cellule**. La réponse des cellules irradiées avec 10 particules α en moyenne et des cellules qui leur sont voisines est donc analysée **indépendamment**.

Différents événements cellulaires sont observés. L'initiation des systèmes de réparation des cassures double brin impliquant γ H2AX et 53BP1, l'apoptose radio-induite et la génération d'espèces réactives de l'oxygène permettent d'apprécier temporellement la réponse cellulaire lorsque 10% de la population est irradiée. D'autre part, l'induction des micronoyaux et de la catatrophe mitotique permettent d'examiner cette réponse cellulaire en fonction de la fraction de la population irradiée (10-100%).

Afin d'appréhender distinctement la réponse cellulaire impliquant ou relevant de l'effet de voisinage, résumons dans un premier temps la réponse cellulaire des cellules ciblées et des cellules voisines.

1.1 Cinétiques des événements cellulaires suite à l'irradiation

Les cinétiques exposées ci-dessous concernent l'irradiation de 10% de la population cellulaire avec 10 particules α des cellules MC3T3. Les cellules voisines ne reçoivent aucune particule, par conséquent la réponse cellulaire observée implique un effet de voisinage induit par les cellules ciblées.

1.1.1 La réponse des cellules voisines

Lorsque 10% de la population cellulaire est irradiée, l'**effet de voisinage** induit des conséquences cellulaires au cours de la première heure suivant l'irradiation (figure 1.1b page 147). Dans la population voisine l'immunodétection de γ H2AX et 53BP1 ne montre pas d'activation dans les trente premières minutes. Le pic d'activation est observé entre 1 et 2 heures après irradiation (dans la même gamme de temps que la population ciblée). Par contre, dans la population *bystander* les dommages à l'ADN potentiellement induits ne conduisent pas à plus long terme à des conséquences détectables avec le test des micronoyaux ou même à la mort cellulaire (apoptose). L'effet de voisinage existe donc, mais il n'est pas assez important pour provoquer, dans la mesure des techniques utilisées ici, des conséquences biologiques aussi importantes que dans les cellules ciblées 24 heures après irradiation.

Parallèlement, une double production d'EROs est observée. Dès trente minutes après irradiation se produit dans les cellules *bystander* une production importante et brève d'EROs d'un niveau identique à celui observé dans les cellules ciblées. Cette production est concomitante avec une consommation du glutathion réduit (15% du stock est consommé). L'activité mitochondriale jusque 6 heures après l'irradiation correspond au second événement de production d'EROs.

1.1.2 Réponse des cellules ciblées et voisines : le bilan

La réponse des cellules voisines est globalement très proche de celle mise en évidence dans les cellules ciblées figure 1.1a page ci-contre, que ce soit d'un point de vue temporel ou même du point de vue du niveau des signaux mesurés.

La réponse des cellules ciblées présentent néanmoins des différences majeures pouvant être résumés en quatre points :

Trente minutes après irradiation :

- L'augmentation du nombre de foyers de CDBs uniquement dans les cellules ciblées,
- Une consommation du glutathion réduit plus importante dans la population ciblée (30%) que dans la population bystander (15%),

Et 24 heures après irradiation :

- Une apoptose radio-induite dans la population ciblée,
- L'induction de micronoyaux dans la population ciblée.

1.2 L'implication des EROs dans l'effet de voisinage

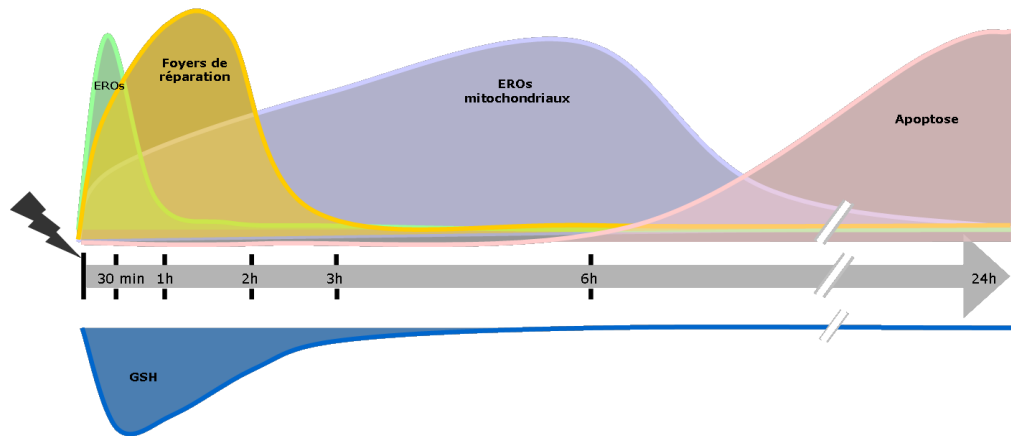
L'effet de voisinage est induit par les signaux émis par les cellules ciblées suite à l'irradiation et **provoque** la réponse observée dans les cellules voisines non irradiées.

L'utilisation de sondes fluorescentes, autorisant l'**observation directe** d'EROS, a permis de mettre en évidence que l'effet *bystander* implique leur **production** suite à l'irradiation par microfaisceau de particules α . Bien que de nombreuses études aient démontré l'implication des radicaux dans la réponse au voisinage (Shao et al., 2008a,b; Sokolov et al., 2005; Chen et al., 2008), parfois même avec des sondes du même type que dans notre étude (Shao et al., 2003c; Lyng et al., 2002b), aucune cinétique n'était réalisée à ce jour.

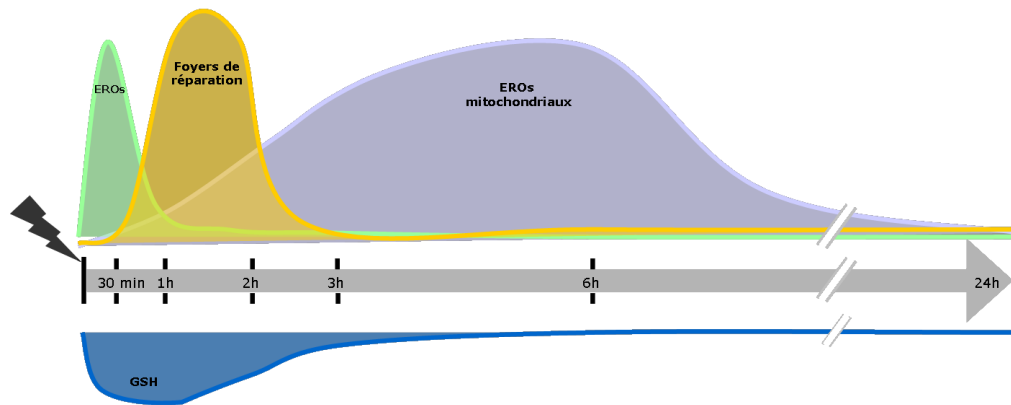
L'observation directe des EROs éclaire sur l'origine **double** de la production d'EROS ainsi que sur la relation **temporelle** entre génération d'EROS et apparition de dommages cellulaires. Les deux sources de production d'EROS **identifiées** sont : la membrane plasmique et les mitochondries.

La membrane

Le rôle de la signalisation membranaire est mis en évidence par l'utilisation de la filipine, agent déstructurant les radeaux lipidiques. Nagasawa et al. (2002) étaient les premiers à considérer l'implication de la membrane dans la réponse *bystander* de cellule CHO incubées en présence de filipine. Suivi ensuite par Shao et al. (2004) qui suggèrent un lien entre membrane, EROs et activation des foyers de réparation des CDBs, lien confirmé par la suite par d'autres équipes (Burdak-Rothkamm et al., 2007; Tartier et al., 2007) dans différents types cellulaires (figures 1.3 page 148 et 1.2 page 148).



(a) Réponse des cellules ciblées



(b) Réponse des cellules voisines

FIGURE 1.1 – Représentation schématique de la cinétique des évènements cellulaires (entre 0 et 24h) suite à l'irradiation de 10% de la population cellulaire par microfaisceau de particules α (10 particules par cible).

Dans les cellules MC3T3, l'observation directe des EROs en fonction du temps post-irradiation est en accord avec les précédentes études, mais présente l'avantage de préciser la cinétique des évènements. Cette dernière permet de déterminer que la signalisation issue de la membrane plasmique est impliquée dans la production massive d'EROs dans la première demi-heure après irradiation. Cette production s'accompagne d'un stress oxydant conséquent jusqu'à deux heures après irradiation, les stocks de glutathion réduits étant diminués de 15%.

De plus, la relation cinétique entre production d'EROs puis activation des foyers de réparation des CDBs (au temps deux heures) renforce les observations de Hu et al. (2006); Chen et al. (2008) et Nagasawa et al. (2008) suggérant que le stress oxydant est responsable

de la formation de dommages à l'ADN. Cette relation cinétique nous permet de poser une hypothèse quant aux mécanismes mis en jeu pour la réparation des cassures double brin de l'ADN. En effet, la cinétique de formation des foyers γ H2AX et 53BP1 présente, dans la cas des MC3T3, un caractère atypique puisque au lieu de montrer un pic dès 30 minutes après l'irradiation, le maximum est retardé entre 1 heure et 2 heures après l'irradiation. Cet **effet retardé**, justifié ici par la présence massive d'EROs 30 minutes après l'irradiation, incite à penser que la réparation des CDBs implique le système ATR connu pour se mettre en place plus tardivement que ATM (Burdak-Rothkamm et al. (2007, 2008)).

Le rôle précoce de la membrane dans la réponse au voisinage est donc majoritaire. Cependant, la dissociation des radeaux lipidiques inhibant de nombreuses protéines de signalisation (dont la NADPH oxydase Shao et al. (2003d)) ou même les jonctions de type gap (selon Nagasawa et al. (2002)), il est impossible de déterminer précisément les signaux impliqués dans le cadre de cette étude sur les MC3T3. La membrane étant néanmoins la première et principale barrière entre une cellule et l'extérieur, son implication dans la transduction des signaux bystander par la voie du milieu ou par la voie des jonctions communicantes est fondamentale.

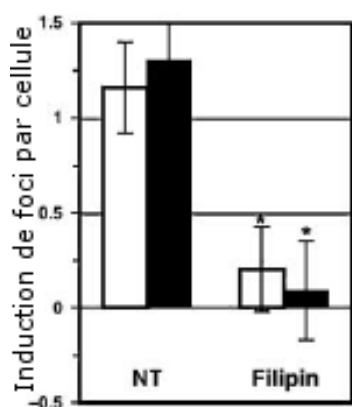


FIGURE 1.2 – L'incubation des cultures (cellules HeLa) en présence de filipine, inhibe l'induction de foyers 53BP1. Cas d'irradiation nucléaire de 5 cellules dans la population étudiée avec 1 particule α . D'après Tartier et al. (2007).

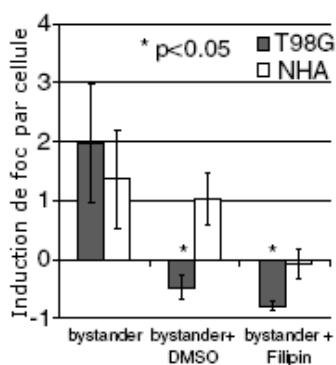


FIGURE 1.3 – Induction de foyers γ H2AX dans les cellules bystander, suite à l'irradiation aux rayons X (2 Gy). Il s'agit d'un système de co-cultures de cellules NHA et T98G. Un type cellulaire est irradié puis l'effet bystander est observé dans le second type cellulaire. D'après Burdak-Rothkamm et al. (2007).

Les mitochondries

Les mitochondries constituent la seconde source de production des EROs dans les cellules *bystander*. La production de radicaux par les mitochondries se distingue de celle de la membrane par leur cinétique. En effet, alors que la membrane est directement impliquée dans le stress généralisé trente minutes après irradiation, la production mitochondriale dure dans le temps, entre 3 et 6 heures après irradiation, et n'entraîne pas de consommation mesurable du stock de glutathion réduit. Les études de Nugent et al. (2007), Zhou et al. (2008) et Tartier et al. (2007) avec des α ainsi que Lyng et al. (2006a) avec des protons engagent des gammes de temps similaires.

Bien que de précédents travaux suggèrent une implication précoce des mitochondries dans l'effet de voisinage (Chen et al., 2008), la production mitochondriale n'ayant pas été déterminée plus tôt (au temps 30 minutes), l'implication des mitochondries ne peut être spécifiée pour les MC3T3 dans la demi-heure suivant l'irradiation.

Alors que la production d'EROs mitochondriales est établie dans les cellules *bystander*, les conséquences en terme de dommages ou de mort cellulaire le sont moins. Dans d'autres types cellulaires, les mitochondries sont directement impliquées dans la formation de dommages à l'ADN ou même l'apoptose (Chen et al., 2008; Nugent et al., 2007; Tartier et al., 2007). Dans le cas des MC3T3, l'activation des foyers de réparation des CDBs semblent majoritairement dépendre de la signalisation membranaire (tout au moins deux heures après l'irradiation) et les cellules *bystander* ne subissent pas d'apoptose radio-induite ou de catastrophe mitotique.

Au demeurant, les mitochondries étant impliquées dans la réponse *bystander*, reste à déterminer par quelle voie elles sont activées. Deux mécanismes principaux peuvent être proposés : l'activation par la voie des céramides, impliquant la membrane plasmique, et le calcium, médiateur d'activation des mitochondries (Boneh, 2006).

1.3 L'effet de voisinage est observé dans les cellules *bystander* et les cellules ciblées

Le test de l'induction de micronoyaux par blocage de la cytokinèse permet de mesurer le facteur Y_{mn} reflétant le taux moyen de micronoyaux (MN) dans une cellule d'une population donnée après irradiation. Un micronoyau se forme au cours de la division cellulaire lorsqu'un dommage à l'ADN mal ou non réparé induit la perte d'un fragment de chromosome, voir d'un chromosome entier. Le facteur Y_{mn} reflète donc le taux moyen de dommages pour une cellule.

Les résultats exposés dans ce mémoire ont permis d'observer les dommages induits 24 heures après l'irradiation pour différentes fractions de la population irradiée (10 à 100%). L'induction des micronoyaux a été observée selon deux points de vue.

L'induction des micronoyaux est dans un premier temps observé en fonction de la population globale, ce qui permet de mettre en évidence que le facteur Y_{mn} augmente (linéairement) en fonction de la fraction cellulaire irradiée et donc par extension, de la dose reçue par la population globale. Cette relation linéaire, correspondrait d'après les estimations de Shao et al. (2003b,c) à une réponse cellulaire uniquement dépendante de la dose sans effet de voisinage.

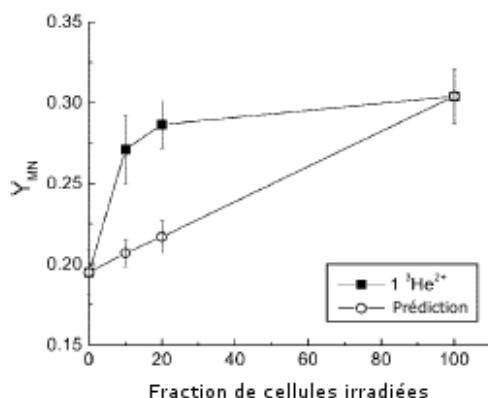


FIGURE 1.4 – Induction de micronoyaux dans une population où différentes fractions sont irradiées avec une particule α par cellule. Les carrés correspondent aux résultats expérimentaux et les cercles, aux prédictions sans effet de voisinage. D'après Shao et al. (2003c).

Cependant, l'effet de voisinage est mis en évidence lorsque l'induction des micronoyaux est étudiée dans la population ciblée et *bystander* indépendamment, ce qui permet de s'affranchir de cet effet de dose. La relation linéaire observée précédemment dans la population globale se compose en réalité de deux réponses distinctes :

1. la réponse des cellules ciblées qui se stabilise lorsque la fraction de cellules irradiées est élevée,
2. la réponse des cellules voisines induite par effet de voisinage lorsque la fraction de la population irradiée est supérieure à 20%.

Bien que de nombreux travaux utilisent ce test pour mettre en évidence la génotoxicité induite par l'irradiation dans le cadre d'effet *bystander*, aucune étude à ce jour ne présente l'induction de micronoyaux indépendamment pour chaque population.

Ces observations indépendantes mettent en évidence un phénomène d'**amplification** de la réponse cellulaire, notamment dans les cellules ciblées. En effet, lorsqu'une cellule ciblée est irradiée avec 10 particules, un certain niveau de dommages est induit en conséquence. Or dans notre cas, ce niveau de dommages augmente avec la fraction de la population ciblée. En d'autres termes, une cellule ciblée entourée d'autres cellules ciblées montre donc un niveau de dommages beaucoup plus élevé qu'une cellule ciblée entourée de cellules non ciblées.

Cette amplification de la réponse cellulaire n'est pas due à une augmentation de la dose reçue par la population globale, la réponse cellulaire étant analysée indépendamment pour chaque population. L'amplification de la réponse est donc liée aux **signaux cellulaires**

émis par les **cellules ciblées**. Dans les cellules voisines, ce phénomène d'amplification correspond explicitement à la description de l'**effet de voisinage**. Mais il apparaît ici que les cellules ciblées peuvent aussi recevoir ce signal et y répondre. De plus, quelle que soit la population, ciblée ou *bystander*, le niveau de dommages cellulaires observé (en terme d'induction de MN) semble s'incrémenter sur le pourcentage de cellules émettrices de signaux.

Ce phénomène d'amplification traduit l'existence d'un effet de voisinage dont la définition s'éloigne légèrement de celle proposée par Djordjevic (2000) où les signaux *bystander* provenant des cellules irradiées vers les cellules non irradiées sont unilatéraux. En effet, les signaux émis par les cellules irradiées ont pour cible les cellules voisines irradiées et voisines non irradiées.

Ces observations mènent à considérer une culture cellulaire comme un réseau complexe de communication où signaux dus à l'irradiation elle-même et signaux émis par les cellules ciblées interviennent. Toute cellule, irradiée ou *bystander*, est susceptible de recevoir le signal émis par les cellules irradiées. Lorsque les cellules ciblées sont proches les unes des autres, il faut donc considérer que leur réponse se compose à la fois de la réponse due à l'irradiation directe et de la réponse due aux signaux émis par ces cellules ciblées.

1.4 Implication de l'effet de voisinage dans les cellules ciblées

Le protocole d'irradiation mis en place pour l'étude de la réponse cellulaire en fonction du temps après irradiation est basé sur l'irradiation de 10% de la population cellulaire. Or dans notre cas, ces 10% de cellules ne sont pas isolées les unes des autres, elles sont disposées en groupe au centre du puit de culture (figure 1.5). La réponse des cellules ciblées est donc composée de la réponse induite par l'irradiation et de l'effet de voisinage entre cellules ciblées tandis que la réponse des cellules *bystander* correspond uniquement à la réponse induite par effet de voisinage.

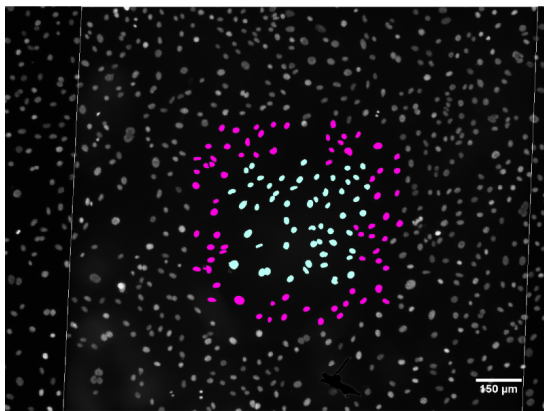


FIGURE 1.5 – Sélection de 10% de la population cellulaire pour l'irradiation (cellules ciblées en bleu, cellules *bystander* en rose, les couleurs sont ajoutées informatiquement).

Les irradiations réalisées en présence de filipine ont permis de déterminer que les signaux issus de la membrane plasmique étaient impliqués dans l'amplification de la réponse des

cellules relative à l'augmentation du nombre de micronoyaux en fonction de la fraction de population irradiée. Par conséquent, la signalisation membranaire est impliquée dans l'effet de voisinage entre cellules ciblées ainsi que dans l'effet de voisinage vers les cellules *bystander*.

Il était de plus noté (section 3.1.3 page 133) que la présence de radicaux 30 minutes après irradiation, ou même la génération d'EROs par les mitochondries, se produisant dans des gammes de temps relativement longues par rapport à la durée de vie d'un radical (de l'ordre de 10^{-9} seconde), ne pouvait pas être imputée à l'effet indirect des radiations (par ionisation de l'eau). Ces EROs semblent plutôt indiquer l'implication d'une signalisation cellulaire conduisant à leur production que ce soit dans la population ciblée ou voisine. Comme l'a démontré Hafer et al. (2008), l'induction d'EROs par effet *bystander* peut de plus se produire dans les toutes premières minutes suivant l'irradiation.

Les expériences réalisées en présence de filipine ont permis de confirmer l'implication d'une signalisation en déterminant l'influence de la signalisation membranaire :

- dans la production de EROs cellulaires 30 minutes après irradiation,
- dans l'activation des foyers γ H2AX et 53BP1 de l'ADN, 2 heures après irradiation.

La particularité de ces observations correspond au fait qu'elles soient valables autant dans les cellules ciblées que dans les cellules *bystander*.

En conséquence, l'hypothèse suivante est proposée : la réponse cellulaire impliquant la brève mais importante production d'EROs à 30 minutes puis le pic d'activation des réparations des CDBs à 2 heures après irradiation est induite par l'effet de voisinage dans les cellules ciblées et *bystander*. Cependant, les voies de signalisation induisant l'effet *bystander* n'étant pas clairement identifiées, il est difficile d'évaluer avec exactitude la part à imputer à l'effet de voisinage dans la réponse des cellules ciblées.

De plus, ces signalisations se révèlent extrêmement complexes car comme l'a démontré Tartier et al. (2007) dans des cellules HeLa, même si la membrane joue un rôle dans la formation de dommages à l'ADN après irradiation nucléaire, il n'est pas de même lors d'irradiations cytoplasmiques. D'ailleurs, concernant les cellules MC3T3, l'observation de la catastrophe mitotique en fonction de la fraction de la population irradiée souligne aussi cette complexité. Dans ce cas, l'utilisation de la filipine révèle que la signalisation membranaire intervient dans ce phénomène pour les cellules ciblées, mais peut être pas pour les cellules voisines.

1.5 La notion de distance et l'effet de voisinage

L'étude de la réponse des MC3T3 suite à l'irradiation ciblée démontre un effet de voisinage s'étendant à une distance maximale de 150 μ m. Cependant, comme cette distance est imposée lors de la détermination des conditions expérimentales, estimer la dépendance spatiale de l'effet *bystander* n'est pas réalisable au delà.

A ce jour, certaines études apportent des indices quant à cette notion. Suite à une irra-

diation ciblée avec des rayons X, Schettino et al. (2003) montre un effet *bystander* jusqu'à 3 mm de distance. Dans des tests effectués sur des tissus épidermiques reconstitués *in vitro*, l'apoptose et des MN sont induits uniformément jusque 1 et 0,6 mm respectivement à partir de la zone irradiée (Belyakov et al. (2005)). *In vivo*, Koturbash et al. (2006) ont aussi mis en évidence l'induction de RAD51 par effet *bystander* dans des tissus situés à 1 cm du tissu irradié avec des rayons X. Dans le cas d'irradiation α de fibroblastes AG1522 confluents, l'induction de foyers γ H2AX est mis en évidence Hu et al. (2006) dans des cellules situées à 7,5 mm de la cellule irradiée (figure 1.6).

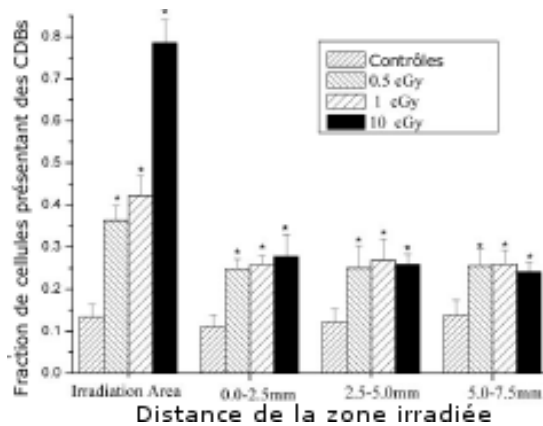


FIGURE 1.6 – Induction de CDBs mesurée 30 minutes après irradiation α dans les cellules irradiées et *bystander*. D'après Hu et al. (2006).

Les distances mises en jeu peuvent donc être importantes. L'impact de l'effet de voisinage dans l'ensemble des cellules d'une même culture peut par conséquent prendre des proportions beaucoup plus importantes si l'on considère que toute cellule, irradiée ou non, est susceptible de montrer une réponse *bystander*.

1.6 Conclusion : l'effet de voisinage, une amplification de la réponse cellulaire

Nos observations fournissent une vision globale au cours de temps de la réponse *bystander* après l'irradiation ciblée, réponse se composant d'un stress généralisé et mitochondrial. L'ensemble démontre donc qu'un mécanisme impliquant deux productions distinctes de radicaux participent à la réponse *bystander* des cellules MC3T3. La membrane est impliquée précocément dans le stress généralisé et induit des dommages à l'ADN dans les deux premières heures suivant l'irradiation alors que les mitochondries sont impliquées dans une production à plus long terme, mais sans conséquences cellulaires déterminées à ce jour.

Comme l'ont déjà souligné Shao et al. (2003b), l'effet de voisinage correspond, de par sa définition première, à une amplification de la réponse originelle des cellules ciblées, les cellules *bystander* présentant des dommages additionnels. Dans le cas des cellules MC3T3, ce processus d'amplification de la réponse cellulaire est plus étendu. En effet, l'effet de voisinage ne suit pas une route unique des cellules ciblées par l'irradiation vers les cellules voisines non irradiées. Une cellule irradiée peut aussi recevoir ce signal et y répondre. Ce

processus pourrait jouer un rôle considérable dans la réponse *bystander* qui serait donc d'une plus grande importance quand la cellule irradiée est aussi une cellule voisine.

Bien que des travaux complémentaires soient nécessaires pour approfondir les mécanismes mis en jeu pour la transmission des signaux *bystander* dans d'autres lignées cellulaires et notamment des lignées humaines, de nouvelles interrogations s'imposent. L'effet de voisinage pouvant intervenir sur des distances relativement grandes si l'on se place à l'échelle cellulaire, quelles sont les incidences concernant les risques associés d'un point de vue radioprotection pour de l'exposition à de faibles doses d'irradiation ?

2

Irradiation par microfaisceau : la place du laboratoire Pierre Süe dans la communauté

CONCEVOIR UN MICROFAISCEAU de particules **idéalement** dédié à l'irradiation de cellules en culture requiert différentes exigences. Ces conditions sont toutes liées à l'adaptation de l'installation à la pratique de la biologie et à la reproductibilité des irradiations. Mais la pratique de la biologie implique d'établir un compromis entre la capacité de la plateforme d'irradiation et l'environnement biologique.

Des conditions de pratique de la biologie appropriées : le point fort de l'installation

Le développement de la plateforme d'irradiation du laboratoire Pierre Süe est principalement basé sur le respect des conditions de culture cellulaire au sein de l'installation.

L'installation a donc nécessité de nombreuses adaptations techniques. La première d'entre elles a été la déflexion du faisceau à la verticale, dès le début du projet de création d'une plateforme d'irradiation en 2004. Point de départ du projet initiant les travaux exposés dans ce mémoire, l'ajout d'un électroaimant correspond à la création d'une troisième ligne de faisceau au laboratoire Pierre Süe totalement dédiée à l'irradiation de cellules.

Le faisceau est donc vertical, sa taille est réduite par un collimateur (afin d'obtenir un microfaisceau) et il permet une irradiation par le dessous des échantillons biologiques. De ce fait, le plan d'irradiation horizontal correspond au plan normal de culture cellulaire (?). Les cellules sont cultivées dans des boîtes de cultures spécifiquement conçues pour s'adapter aux contraintes géométriques imposées par l'installation mais néanmoins permettant le maintien et la croissance de cellules en dehors de l'installation dans des

conditions standard. Au sein de l'installation d'irradiation, ces échantillons biologiques sont aussi maintenus dans une atmosphère contrôlée en température, gaz et humidité grâce à l'intégration d'un incubateur et d'une chambre micro-environnementale montés sur mesures.

Aujourd'hui, la plateforme d'irradiation est opérationnelle. Le protocole d'irradiation est lui-même élaboré de façon à limiter les biais apportés par le stress cultures cellulaires. Le repérage des cibles est effectué *via* une coloration au hoechst avec une concentration minimale et l'exposition aux UV du microscope pendant l'acquisition est aussi minimisée. De plus, contrairement à la plupart des installations travaillant sur des grandes surfaces, les puits de cultures conçus ici, d'une surface de 2,25 mm², permettent une acquisition d'image (au grossissement 50 ×) pour le repérage des positions en un champ unique. Ceci évite l'exposition répétée aux UV du microscope nécessaire pour la reconstitution d'échantillons de grande surface.

Favoriser les conditions de cultures cellulaires au sein de l'installation ne dégrade pas la qualité du faisceau ni la précision de ciblage. Par contre, ceci impose une certaine limite dans la numération des particules pendant l'irradiation.

Les limites de l'installation

Une première limite est liée à la taille du faisceau, dû au choix technologique adopté pour sa production. En effet, les systèmes focalisés montrent des performances meilleures en qualité de ciblage, le faisceau pouvant atteindre une taille sub-micrométrique. Au laboratoire Pierre Süe, la collimation montre une performance de ciblage de l'ordre de 10 μm .

Mais la limite majeure de l'installation correspond au dénombrement *in situ* des ions. Cette limite influe principalement sur la vitesse d'irradiation. Or, la vitesse de l'irradiation est en général considérée comme un paramètre important dans le cas d'irradiation par microfaisceaux. En effet, plus l'irradiation est rapide, plus le nombre de cellules irradiées est important et plus il est aisé d'étudier des phénomènes biologiques dont les fréquences d'apparition sont rares. Dans la configuration mise en place au laboratoire Pierre Süe, la vitesse est déterminée par le temps de pose nécessaire à la délivrance de 10 particules et au nombre de cibles à irradier. Dans le cadre des études réalisées et présentées dans ce mémoire, cette limite n'a pas d'incidence, de par le fait que l'étude de la réponse cellulaire est basée sur l'observation d'évènements non rares et mesurables par le biais de techniques fluorescentes (changement du statut rédox, activation des systèmes de réparation de l'ADN lié à ATM, induction de micronoyaux...).

Améliorer le système de dénombrement des ions pendant l'irradiation est un point clef des développements futurs au sein de l'installation. En effet, contrôler le nombre d'ions envoyé à chaque cible permettrait d'irradier en deçà de 10 particules par cible. Mais il est à souligner qu'à ce jour, la majorité des études portant sur la réponse cellulaire en

fonction du nombre de particules reçue par cible (généralement entre 1 et 10) mettent en évidence que quelque soit le nombre de particules, la réponse cellulaire est généralement du même ordre de grandeur (Shao et al., 2004, 2006a; Prise et al., 1998). D'autre part, dans le cadre particulier de l'étude de l'effet de voisinage, de nombreuses installations d'irradiation par microfaisceaux participent à la compréhension de ce phénomène en pratiquant des irradiations de l'ordre 10 à 20 particules α par cible (Zhou et al., 2000; Tartier et al., 2007).

La place du laboratoire dans la communauté

En conclusion, d'un point de vue biologique la plateforme d'irradiation présente les caractéristiques requises pour la pratique d'études en radiobiologie car travailler sur matériaux biologiques au sein de l'installation est réalisable dans des conditions parfaitement adaptées. D'autre part, d'un point de vue technique le microfaisceau autorise les études portant plus précisément sur l'effet de voisinage car il permet d'irradier (d'une manière semi-automatique) une cible biologique définie. Par contre, l'irradiation par microfaisceau ne peut être réalisée avec un nombre d'ions contrôlé *in situ*. En effet, irradier en deçà de 10 particules α par cible n'est pas praticable à ce jour.

Néanmoins, les caractéristiques techniques de la plateforme d'irradiation du laboratoire Pierre Süe, déjà répertoriées dans la littérature par Bigelow et al. (2008), sont équivalentes aux autres installations, mais présente en plus une capacité d'accueil de cultures cellulaires plus adaptée. Au demeurant, les installations d'irradiation par microfaisceau sont intrinsèquement des installations en perpétuelle évolution et adaptations techniques. L'équipe travaillant autour de la microsonde nucléaire et de la plateforme d'irradiation œuvre à ce jour à l'amélioration du système. Plus particulièrement, l'installation d'un moteur piezzo électrique encadrant le collimateur permettra sous peu d'augmenter la vitesse d'irradiation en couplant les déplacements de la platine porte-échantillon au déplacement du collimateur.

Les microfaisceaux collimatés ou focalisés montrent généralement de bonnes performances pour l'irradiation d'une cellule unique avec un ou plusieurs ions. Certaines installations ont déjà produit des données d'un grand intérêt concernant l'étude des effets à faible dose d'irradiation. Mais il doit être notifié que les différentes conditions d'irradiation sont uniques et caractéristiques de chaque installation que ce soit en terme de qualité du faisceau, du système de reconnaissance des cellules, de la détection des particules, du système de maintien des échantillons biologiques et de leur préparation. Tout cela complique une comparaison directe des résultats expérimentaux obtenus dans les différents laboratoires.

3

Conclusion générale

LES TRAVAUX développés au cours de cette thèse sont représentatifs de la pluridisciplinarité de la radiobiologie, science basée sur l'étude des effets des rayonnements et notamment des rayonnements ionisants sur les êtres vivants. Dans le cadre des effets non ciblés observés à faible dose d'irradiation, et en particulier l'effet de voisinage, l'utilisation d'installations spécifiques comme les microfaisceaux, sont moteurs d'avancées majeures.

Entre physique et biologie, deux objectifs étaient préalablement posés au début de cette thèse. L'objectif premier consistait à élaborer une plateforme d'irradiation biocompatible, c'est-à-dire favorisant de façon optimale la pratique de la biologie cellulaire au sein de l'installation. Le second objectif était de participer à la compréhension de l'effet de voisinage suite à l'irradiation ciblée par l'étude de l'implication des espèces réactives de l'oxygène dans la réponse *bystander*.

Aujourd'hui, la plateforme est biocompatible et fonctionnelle. Le microfaisceau permet d'irradier sélectivement une cellule définie au niveau de son noyau avec dix particules α en moyenne. La réponse cellulaire est analysée cellule par cellule. Les réponses de la population ciblée et de la population voisine sont ainsi étudiées indépendamment.

L'étude réalisée sur des cellules normales ostéoblastiques (les MC3T3) apporte un regard nouveau sur l'effet de voisinage, caractérisé par un stress cellulaire d'origine double, la membrane et les mitochondries. Cet effet de voisinage peut toucher toutes les cellules d'une culture : les signaux *bystander* n'ont pas de cible définie. Ainsi toute cellule, irradiée ou non, peut recevoir ces signaux et répondre. Les cultures cellulaires sont des réseaux complexes ; leur réponse à l'irradiation indique une relation mêlée entre signaux relatifs à l'irradiation elle-même et réponse au voisinage conduisant à une amplification.

Ces travaux basés sur la caractérisation des cinétiques de réponses (en terme de dom-

mages et production de EROs), ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension de l'effet de voisinage mais souligne aussi l'importance d'études globales portant sur tous les facteurs connus pour être impliqués dans ce phénomène. Les perspectives propres à cette étude basée sur le type cellulaire MC3T3 sont multiples et peuvent être résumées en quatre points principaux :

- L'activation de la membrane et des mitochondries dépend t'elle du même mécanisme ? Déterminer plus précisément les voies de communications cellulaires impliquées dans l'effet de voisinage à des temps très courts après l'irradiation via l'étude des mécanismes d'activation des signaux membranaires et mitochondriaux. L'implication du $TGF\beta$, des voies de signalisation faisant intervenir les MAP kinases, l'activation de la NADPH oxydases sont autant de facteurs pouvant intervenir dans l'effet de voisinage.
- La double génération d'EROs, à court terme initiée par la membrane et à long terme initiée par les mitochondries, sont-elles engagées chacune dans un processus différent tels que la protection de tissu, la cancérogénèse?...). Etudier les conséquences biologiques des EROs en terme de dommages à l'ADN et dommages cellulaires en général (particulièrement les dommages oxydatifs permettraient d'initier une réponse à cette question.
- Quelle est la contribution de l'effet de voisinage induits dans les cellules ciblées par l'irradiation dans la réponse d'une culture ou d'un tissu ? L'effet de voisinage pouvant voyager sur de longues distances, une étude méthodique de l'impact de la réponse *bystander* (et en particulier l'implication des EROs) en fonction de la distance à la cellules irradiée participerait à mieux appréhender les communications complexes entre cellules et à identifier clairement l'impact de l'effet bystander dans une population, voire dans un tissu.
- L'effet de voisinage est-il type cellulaire dépendant ? Les mécanismes impliqués sont-ils les mêmes dans chaque type cellulaire ? Mettre au point une étude comparative entre différents types cellulaires dans les mêmes conditions expérimentales permettrait de s'affranchir des problèmes liés à la variété d'installations d'irradiation et de protocoles. Cette comparaison contribuerait fortement à comprendre l'impact de l'effet de voisinage en fonction du type cellulaire et donc en fonction de la physiologie adaptée de chaque type cellulaire.

D'autres perspectives sont envisageables dans le domaine de la toxicologie nucléaire, notamment dans la détermination de la toxicité de l'uranium. Le choix de cette lignée ostéoblastique était établi dans le but de mener à long terme des études comparant toxicité chimique et radiologique de l'uranium, métal lourd stocké dans les os après contamination interne. Le phénomène d'amplification de la réponse cellulaire par effet de voisinage pouvant potentiellement contribuer à l'apparition de dommages devrait donc être pris en considération dans les futures études.

En finalité, l'effet de voisinage est étudié à travers le monde sur différents types cellu-

lares et avec des rayonnements de TEL variés depuis une quinzaine d'année. Cependant l'incidence en radioprotection et notamment sur la relation linéaire sans seuil n'est pas clairement déterminée, la difficulté provenant principalement de la variété de matériels biologiques et techniques utilisés à ce jour, couplés au fait que ces effets observés à faible dose d'irradiation relèvent généralement des niveaux d'expositions environnementales. Le développement de programmes internationaux encadrant l'ensemble des facteurs mis en jeux sont peut-être la clef permettant *in fine* de définir des règles de protection adaptées.

Annexes



Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'analyse multiparamétrique sur plusieurs milliers de cellules isolées. Les mesures simultanées de caractéristiques physiques et biologiques sont effectuées isolément sur chacune d'entre-elles lorsque, entraînée par un fluide au centre d'une veine liquide, elle traverse la source d'excitation lumineuse (faisceau laser). Après intersection du rayon incident, la cellule diffracte la lumière. L'intensité de la lumière diffractée dans l'axe (angle $< 12^\circ$), est proportionnelle à la taille de la cellule (**FSC : forward scatter**) ; celle diffractée à 90° est représentative de son contenu cytoplasmique (**SSC : side scatter**).

Les signaux détectés par le système optique sont amplifiés, convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques. Elles sont analysées grâce à l'unité informatique du cytofluorimètre. L'affichage simultané des paramètres, FSC, SSC traités par le logiciel, visualise chaque cellule sur écran sous forme de point. C'est le cytogramme, nuage de signaux punctiformes qui apparaît (figure A.1 page suivante).

Selon les deux paramètres, il est possible de distinguer différentes populations cellulaires et de tracer le contour de la population à étudier en excluant d'une part les débris sur les critères de petite taille (FSC) et petite granularité (SSC) et d'autre part les agrégats situés très haut dans la partie supérieure de l'écran. La zone d'intérêt ainsi délimitée (appelée fenêtre ou région) est la population cellulaire homogène. Seules les valeurs concernant cette région sont analysées par l'emploi du logiciel. D'autres paires de signaux comme FSC et Fluorescence peuvent être considérées, de nouveaux points apparaissent représentant chacun une cellule en fonction de sa taille et de la fluorescence qui lui est associée. La relation entre la population de la zone d'intérêt et la fluorescence nécessite une autre présentation des données. Elles sont représentées par des histogrammes de distribution de fréquence : l'axe horizontal correspond à l'étendue des canaux, l'axe vertical au nombre de cellules par canal (figure).

Le nombre de canaux est de 0 à 1023 en échelle linéaire, de 0 à 104 en mode logarithmique utilisé souvent pour les mesures d'intensité de fluorescence dont les valeurs peuvent varier de plusieurs ordres de grandeur. L'histogramme monoparamétrique de la fluorescence montre la distribution des cellules marquées.

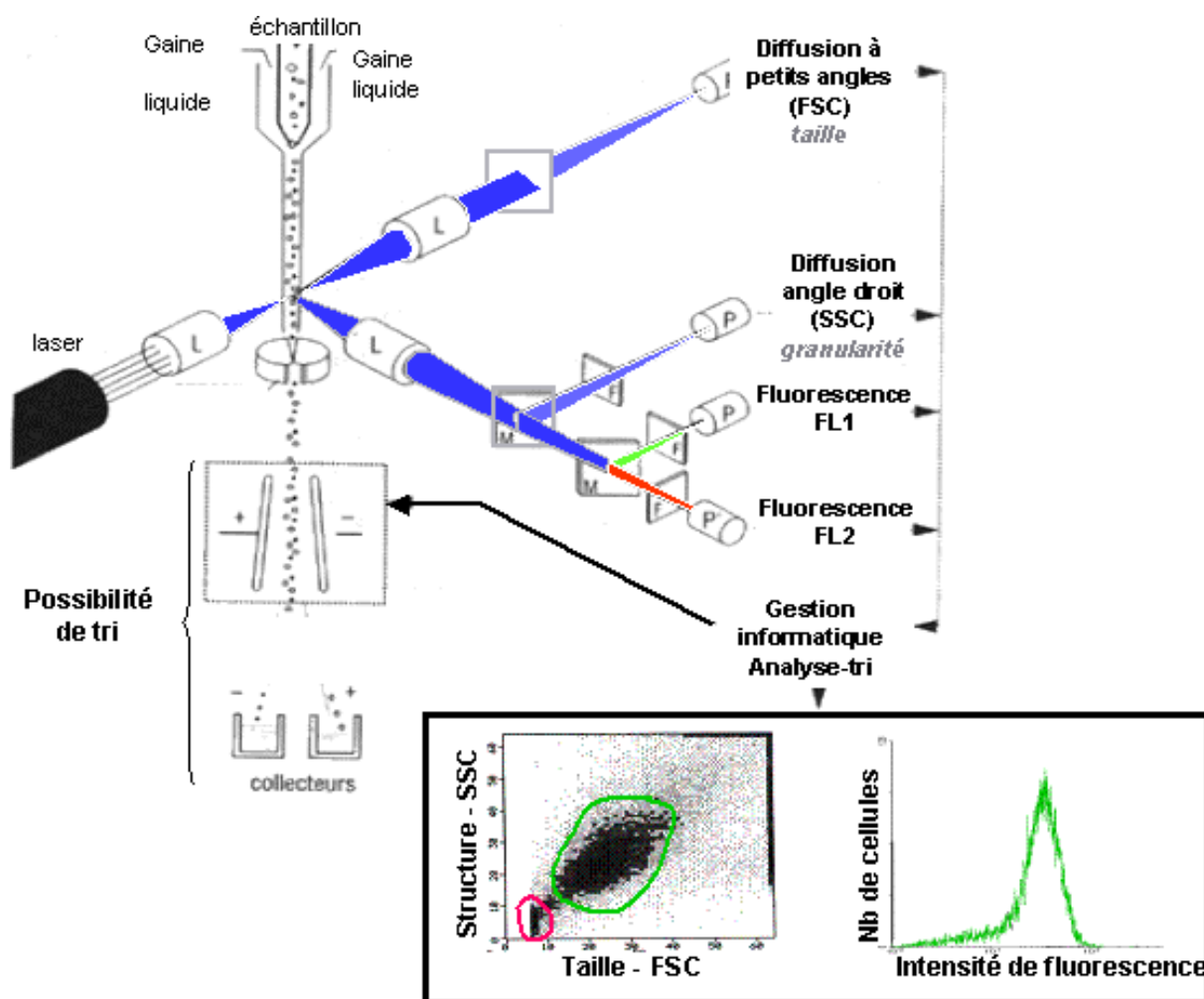


FIGURE A.1 – La cytométrie en flux.

Les mesures de taille, de contenu cellulaire, de fluorescence étant réalisées, l'exploitation de ces données permet au sein d'une population cellulaire homogène d'exprimer en pourcentages, les cellules marquées. Le cytofluorimètre d'analyseur de cellules peut être équipé pour devenir trieur de cellules. Les cellules repérées sont déviées vers un tube collecteur et ainsi isolées. La déflexion est réalisée en utilisant des gouttelettes chargées électriquement dans lesquelles se situent les cellules et sont déviées par un champ électrique permettant ainsi le regroupement de sous-populations cellulaires pures.



Microsonde nucléaire : techniques d'analyse et de caractérisation

De nombreuses techniques de caractérisation peuvent être mises en œuvre, souvent simultanément, auprès d'une microsonde nucléaire.

PIXE (Particle Induced X-ray Emission) : la détection des raies X caractéristiques émises par les cortèges électroniques des atomes excités par les ions incidents, permet de déterminer la teneur de tous les éléments présents plus lourds que le sodium, parfois même que le carbone lorsque des détecteurs particuliers sont employés. En effet les photons X émis par les éléments plus légers sont trop peu énergétiques pour être détectés. C'est donc une analyse chimique élémentaire (accès au nombre Z de protons) avec une sensibilité donnant accès à des éléments trace jusqu'à des concentrations de l'ordre de la ppm.

PIGE (Particle Induced Gamma-ray Emission) consiste à mesurer le spectre gamma émis par les noyaux des atomes excités (excitation coulombienne en général) afin de doser certains éléments légers (typiquement Z inférieur à 19). L'identification est isotopique (accès à Z et au nombre de masse A).

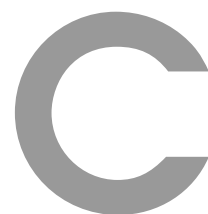
NRA (Nuclear Reaction Analysis) permet, en choisissant la nature des ions incidents et leur énergie, d'induire des réactions nucléaires particulières, parfois résonnantes. Avec des ions de quelques MeV, seuls les éléments légers peuvent être dosés, en raison de la barrière coulombienne trop élevée des noyaux lourds qui interdit toute interaction nucléaire. On détecte alors soit les particules légères produites par la réaction, soit le rayonnement gamma émis. La probabilité de réaction présente parfois une résonance étroite en fonction de l'énergie du faisceau incident. En faisant varier celle-ci, on peut alors déterminer des profils de concentration en profondeur dans

l'échantillon. Cette méthode est également isotopique (accès à A et Z).

RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry) consiste à mesurer l'énergie des ions après rétrodiffusion sur les noyaux cible. Cette énergie étant caractéristique de la masse du noyau diffuseur, on a ainsi accès au nombre de masse A. Les ions subissant un ralentissement électronique dans la matière traversée, la méthode est sensible à la topographie et à l'organisation en profondeur du matériau étudié (par exemple ordonnancement et épaisseur de couches minces, localisation d'impuretés ou de contaminations en surface...). En milieux organiques, elle permet en outre d'accéder à la teneur en éléments majeurs de l'échantillon (carbone, azote, oxygène) et donc à sa masse.

STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy) donne accès à l'épaisseur de l'échantillon (ou plus exactement à sa masse surfacique en g/cm^2), grâce à la mesure de la perte d'énergie du faisceau après traversée de la cible. En mode imagerie, elle permet de déterminer la structure d'une coupe mince avec un contraste en densité (structure d'une coupe de tissus biologiques par exemple). Comme la méthode RBS, la méthode STIM permet d'accéder à la masse d'échantillons organiques.

Cette grande diversité de techniques offre une richesse d'information particulièrement intéressante pour la caractérisation de matériaux. En particulier pour ce qui concerne l'analyse élémentaire, il est ainsi possible d'explorer quasiment tout le tableau périodique, parfois même en une seule analyse, tout en conservant intact l'échantillon analysé.



Les Macros développées sous ImageJ pour l'analyse d'image

ImageJ est un logiciel de manipulation et d'analyse d'images que l'on peut faire évoluer grâce à la création de macros (dans un langage propre au logiciel). Les macros ci-dessous (annexées afin qu'elles puissent être réutilisées) permettent d'automatiser un ensemble de traitement d'images pour la mesure de fluorescence. Les commentaires de codes débutent par le symbole %.

C.1 Analyse de forme et enregistrement de la région d'intérêt définie par chaque objet

```
list = getFileList(dir);  
% pour se référer à un dossier où se trouve les images à analyser  
  
for (i = 0; i < list.length; i++)  
path = dir + list[i];  
% Description du chemin de chaque fichier image  
  
open(path);  
selectImage(1);  
% selection de l'image pour l'analyser  
  
run("Analyze Particles...",  
"size=500-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing add");  
% analyse des objets selon leur taille et leur circularité
```



```
roiManager("Save", path + "-RoiSet.zip");  
% Enregistrement des ROI (région d'intérêt) correspondant à chaque objet  
dans un fichier du même nom mais avec une extension -RoiSet.zip.
```

```
roiManager("Delete");  
close();
```

C.2 Mesure de la fluorescence à partir d'une région d'intérêt

```
list = getFileList(dir);  
% pour se référer à un dossier où se trouve les images à analyser  
  
for (i = 0; i < list.length; i++)  
path = dir + list[i];  
% Description du chemin de chaque fichier image  
  
open(path);  
% Ouverture de l'image de fluorescence sur laquelle doit être effectuer les mesures  
path2 = dir + list[i] + "-RoiSet.zip";  
roiManager("Open", path2);  
% Ouverture du fichier contenant les ROI  
  
roiManager("Measure");  
% Mesure de la fluorescence dans chaque ROI  
roiManager("Delete");  
close();  
i++;
```

Bibliographie

- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E., Tice, R., Waters, M. D., and Aitio, A. (2000). Ipcs guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. international programme on chemical safety. Mutat Res, 463(2) :111–172.
- Alper, T. (1960). Cellular radiobiology. Annu Rev Nucl Sci, 10 :489–530.
- Alper, T., Gillies, N. E., and Elkind, M. M. (1960). The sigmoid survival curve in radiobiology. Nature, 186 :1062–1063.
- Alphonse, G., Aloy, M. T., Broquet, P., Gerard, J. P., Louisot, P., Rousson, R., and Rodriguez-Lafrasse, C. (2002). Ceramide induces activation of the mitochondrial/caspases pathway in jurkat and scc61 cells sensitive to gamma-radiation but activation of this sequence is defective in radioresistant sq20b cells. Int J Radiat Biol, 78(9) :821–835.
- Awasthi-Kalia, M., Schnetkamp, P. P., and Deans, J. P. (2001). Differential effects of filipin and methyl-beta-cyclodextrin on b cell receptor signaling. Biochem Biophys Res Commun, 287(1) :77–82.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., Gooding, T., and Little, J. B. (1998). Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. Radiat Res, 150(5) :497–504.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., and Little, J. B. (2001). Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(2) :473–478.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., and Little, J. B. (2003a). Expression of connexin43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses. Cancer Res, 63(21) :7128–7135.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., and Little, J. B. (2003b). Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. Oncogene, 22(45) :7050–7057.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., and Little, J. B. (2004). Stress signaling from irradiated to non-irradiated cells. Curr Cancer Drug Targets, 4(1) :53–64.

- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., Pykett, M. J., Nagasawa, H., and Little, J. B. (1997). Cdc2 is down-regulated by ionizing radiation in a p53-dependent manner. Cell Growth Differ, 8(11) :1161–1169.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., Raaphorst, G. P., and Mitchel, R. E. (1996). Low-dose ionizing radiation decreases the frequency of neoplastic transformation to a level below the spontaneous rate in c3h 10t1/2 cells. Radiat Res, 146(4) :369–373.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., Waker, A. J., and Little, J. B. (2000). High and low fluences of alpha-particles induce a g1 checkpoint in human diploid fibroblasts. Cancer Res, 60(10) :2623–2631.
- Azzam, E. I., George, I., and Raaphorst, G. P. (1982). Alteration in thermal sensitivity of chinese hamster cells by d2o treatment. Radiat Res, 90(3) :644–648.
- Azzam, E. I. and Little, J. B. (2004). The radiation-induced bystander effect : evidence and significance. Hum Exp Toxicol, 23(2) :61–65.
- Azzam, E. I., Nagasawa, H., Yu, Y., Li, C.-Y., and Little, J. B. (2002a). Cell cycle deregulation and xeroderma pigmentosum group c cell transformation. J Invest Dermatol, 119(6) :1350–1354.
- Azzam, E. I., Raaphorst, G. P., and Mitchel, R. E. (1994). Radiation-induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastic transformation in c3h 10t1/2 mouse embryo cells. Radiat Res, 138(1 Suppl) :S28–S31.
- Azzam, E. I., Toledo, S. M. D., Spitz, D. R., and Little, J. B. (2002b). Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. Cancer Res, 62(19) :5436–5442.
- Azzam, E. I., Vadasz, J. A., and Raaphorst, G. P. (1991). Thermal sensitivity and radiosensitization in chinese hamster V79 cells exposed to 2-aminopurine or 6-thioguanine. Radiat Res, 125(2) :223–226.
- Ballarin, C., Sarto, F., Giacomelli, L., Bartolucci, G. B., and Clonfero, E. (1992). Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. Mutat Res, 280(1) :1–7.
- Barberet, P., Aguer, P., Balana, A., Gault, N., Incerti, S., Lefaix, J., Michelet-Habchi, C., Moretto, P., and Poncy, J. (2004). First experiments on cells using the focused microbeam at cenbg. Radiat Res, 161(1) :91–93.
- Barendsen, G. W. (1994a). RBE-LET relationships for different types of lethal radiation damage in mammalian cells : comparison with DNA dsb and an interpretation of differences in radiosensitivity. Int J Radiat Biol, 66(5) :433–436.
- Barendsen, G. W. (1994b). The relationships between RBE and LET for different types of lethal damage in mammalian cells : biophysical and molecular mechanisms. Radiat Res, 139(3) :257–270.

-
- Barker, S., Weinfeld, M., Zheng, J., Li, L., and Murray, D. (2005). Identification of mammalian proteins cross-linked to DNA by ionizing radiation. J Biol Chem, 280(40) :33826–33838.
- Bartosz, G. (2006). Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. Clin Chim Acta, 368(1-2) :53–76.
- Bassal, S. and El-Osta, A. (2005). DNA damage detection and repair, and the involvement of epigenetic states. Hum Mutat, 25(2) :101–109.
- Bauer, G. (2007). Low dose radiation and intercellular induction of apoptosis : potential implications for the control of oncogenesis. Int J Radiat Biol, 83(11-12) :873–888.
- Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1997). Oxidative decay of DNA. J Biol Chem, 272(32) :19633–19636.
- Beer, J. (1968). Heritable radiation-induced lesions in somatic mammalian cells. Postepy biochemi, 14(3) :463–472.
- Belyakov, O. V., Mitchell, S. A., Parikh, D., Randers-Pehrson, G., Marino, S. A., Amundson, S. A., Geard, C. R., and Brenner, D. J. (2005). Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(40) :14203–14208.
- Benderitter, M., Vincent-Genod, L., Berroud, A., Muller, S., Donner, M., and Voisin, P. (1999). Radio-induced structural membrane modifications : a potential bioindicator of ionizing radiation exposure? Int J Radiat Biol, 75(8) :1043–1053.
- Berger, P. and Revel, G. (2005). Microsonde nucléaire principe et appareillage. Les Techniques de l'Ingénieur P 2563v2.
- Bigelow, A., Ross, G., Randers-Pehrson, G., and Brenner, D. (2005). The columbia university microbeam ii endstation for cell imaging and irradiation. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 231(Sp. Iss. SI) :202–206.
- Bigelow, A. W., Brenner, D. J., Garty, G., and Randers-Pehrson, G. (2008). Single-particle/single-cell ion microbeams as probes of biological mechanisms. IEEE transactions on plasma science, 36(4, Part 2) :1424–1431.
- Bishayee, A., Hill, H. Z., Stein, D., Rao, D. V., and Howell, R. W. (2001). Free radical-initiated and gap junction-mediated bystander effect due to nonuniform distribution of incorporated radioactivity in a three-dimensional tissue culture model. Radiat Res, 155(2) :335–344.
- Bloom, W. and Zirkle, R. E. (1954). Irradiation of small parts of dividing cells. Proc Inst Med Chic, 20(5) :119–120.

- Bloom, W., Zirkle, R. E., and Urezt, R. B. (1955). Irradiation of parts of individual cells. iii. effects of chromosomal and extrachromosomal irradiation on chromosome movements. Ann N Y Acad Sci, 59(4) :503–513.
- Boneh, A. (2006). Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation by second messenger-mediated signal transduction mechanisms. Cell Mol Life Sci, 63(11) :1236–1248.
- Bonini, M. G., Rota, C., Tomasi, A., and Mason, R. P. (2006). The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species : a self-fulfilling prophesy ? Free Radic Biol Med, 40(6) :968–975.
- Brenner, D. J. and Hall, E. J. (2002). Microbeams : a potent mix of physics and biology. summary of the 5th international workshop on microbeam probes of cellular radiation response. Radiat Prot Dosimetry, 99(1-4) :283–286.
- Burdak-Rothkamm, S., Rothkamm, K., and Prise, K. M. (2008). ATM acts downstream of ATR in the DNA damage response signaling of bystander cells. Cancer Res, 68(17) :7059–7065.
- Burdak-Rothkamm, S., Short, S. C., Folkard, M., Rothkamm, K., and Prise, K. M. (2007). Atr-dependent radiation-induced gamma H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells. Oncogene, 26(7) :993–1002.
- Burrows, C. and Muller, J. (1998). Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. Chem Rev, 98(3) :1109–1152.
- Cadet, J., Artignan, X., Berger, M., Douki, T., Gromova, M., Polverelli, M., Ravanat, J.-L., and Richard, M.-J. (1997). Effects of ionising radiation on isolated and cellular DNA. In Radioprotection, volume 32, pages 77–80, France. Editions de Physique. 27th Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology, 1-4 Sept. 1996, Montpellier, France.
- Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.-G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.-L., and Sauvaigo, S. (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. Biol Chem, 383(6) :933–943.
- Cadet, J., Bellon, S., Douki, T., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L., Romieu, A., and Sauvaigo, S. (2004). Radiation-induced DNA damage : formation, measurement, and biochemical features. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 23(1) :33–43.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., and Ravanat, J. (2003). Oxidative damage to DNA : formation, measurement and biochemical features. Mutat Res, 531(1-2) :5–23.
- Chadwick, K. H. and Leenhouts, H. P. (1973). A molecular theory of cell survival. Phys Med Biol, 18(1) :78–87.

-
- Chaudhary, A. K., Reddy, G. R., Blair, I. A., and Marnett, L. J. (1996). Characterization of an n6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Carcinogenesis, 17(5) :1167–1170.
- Chen, H. J. and Chung, F. L. (1996). Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. Chem Res Toxicol, 9(1) :306–312.
- Chen, S., Zhao, Y., Han, W., Zhao, G., Zhu, L., Wang, J., Bao, L., Jiang, E., Xu, A., Hei, T. K., Yu, Z., and Wu, L. (2008). Mitochondria-dependent signalling pathway are involved in the early process of radiation-induced bystander effects. Br J Cancer, 98(11) :1839–1844.
- Cleaver, J. E., Laposa, R. R., and Limoli, C. L. (2003). DNA replication in the face of (in)surmountable odds. Cell Cycle, 2(4) :310–315.
- Costa, R. M. A., Chigan  as, V., da Silva Galhardo, R., Carvalho, H., and Menck, C. F. M. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. Biochimie, 85(11) :1083–1099.
- Cremesti, A., Paris, F., Grassm  , H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins, E., and Kolesnick, R. (2001). Ceramide enables fas to cap and kill. J Biol Chem, 276(26) :23954–23961.
- Cuddihy, A. R. and Bristow, R. G. (2004). The p53 protein family and radiation sensitivity : Yes or no ? Cancer Metastasis Rev, 23(3-4) :237–257.
- Cummings, M. C., Winterford, C. M., and Walker, N. I. (1997). Apoptosis. Am J Surg Pathol, 21(1) :88–101.
- Daudin, L., Carrière, M., Gouget, B., Hoarau, J., and Khodja, H. (2006). Development of a single ion hit facility at the pierre sue laboratory : a collimated microbeam to study radiological effects on targeted living cells. Radiat Prot Dosimetry, 122(1-4) :310–312.
- Deschavanne, P. and Fertil, B. (1996). A review of human cell radiosensitivity in vitro. Int J Radiat Biol, 34(1) :251–266.
- Djordjevic, B. (2000). Bystander effects : a concept in need of clarification. Bioessays, 22(3) :286–290.
- Dollinger, G., Hable, V., Hauptner, A., Krucken, R., Reichart, P., Friedl, A., Drexler, G., Cremer, T., and Dietzel, S. (2005). Microirradiation of cells with energetic heavy ions. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 231(Sp. Iss. SI) :195–201.
- Donahue, H. J., McLeod, K. J., Rubin, C. T., Andersen, J., Grine, E. A., Hertzberg, E. L., and Brink, P. R. (1995). Cell-to-cell communication in osteoblastic networks : cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. J Bone Miner Res, 10(6) :881–889.

- Durand, R. E. and Olive, P. L. (1982). Cytotoxicity, mutagenicity and DNA damage by hoechst 33342. J Histochem Cytochem, 30(2) :111–116.
- Edwards, G. O., Botchway, S. W., Hirst, G., Wharton, C. W., Chipman, J. K., and Meldrum, R. A. (2004). Gap junction communication dynamics and bystander effects from ultrasoft x-rays. Br J Cancer, 90(7) :1450–1456.
- Elfman, M., Pallon, J., Auzelyte, V., Kristiansson, P., Malmqvist, K., Nilsson, C., Shariff, A., and Wegden, M. (2005). The lund nuclear microprobe sub-micron set-up. part iii : Sample stage, optical imaging and detector configuration in the experimental chamber. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 231(Sp. Iss. SI) :14–20.
- Elkind and Whitmore (1967). The radiobiology of cultured mammalian cells. Gordon and Breach.
- Elkind, M. M., Moses, W. B., and Sutton-Gilbert, H. (1967). Radiation response of mammalian cells grown in culture. vi. protein, DNA, and rna inhibition during the repair of x-ray damage. Radiat Res, 31(1) :156–173.
- Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *c. elegans*. Cell, 44(6) :817–829.
- Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique : a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutat Res, 285(1) :35–44.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. Mutat Res, 455(1-2) :81–95.
- Ferradini, J. P. (1983). Biologie de l'action des rayonnements ionisants. Masson, Paris.
- Fiedler, A., Skopek, J., Reinert, T., Tanner, J., Vogt, J., Osterreicher, J., Navratil, L., and Butz, T. (2004). Irradiation experiments with living cells at LIPSION. Radiat Res, 161(1) :95–96.
- Fimognari, C., Sauer-Nehls, S., Braselmann, H., and NÄ¼sse, M. (1997). Analysis of radiation-induced micronuclei by fish using a combination of painting and centromeric DNA probes. Mutagenesis, 12(2) :91–95.
- Fischer, B., Heiss, M., and Cholewa, M. (2003). About the art to shoot with single ions. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 210 :285–291.
- Folkard, M., Vojnovic, B., Hollis, K., Bowey, A., Watts, S., Schettino, G., Prise, K., and Michael, B. (1997a). A charged-particle microbeam .ii. a single-particle micro-collimation and detection system. Int J Radiat Biol, 72(4) :387–395.

-
- Folkard, M., Vojnovic, B., Prise, K. M., Bowey, A. G., Locke, R. J., Schettino, G., and Michael, B. D. (1997b). A charged-particle microbeam : I. development of an experimental system for targeting cells individually with counted particles. Int J Radiat Biol, 72(4) :375–385.
- Frankenberg D, Greif KD, B. W. L. F.-G. U. (2008). The role of nonhomologous end joining and homologous recombination in the clonogenic bystander effects of mammalian cells after exposure to counted 10 mev protons and 4.5 mev alpha-particles of the ptb microbeam. Radiat Environ Biophys., 47(4) :431–8.
- Funayama, T., Wada, S., Yokota, Y., Fukamoto, K., Sakashita, T., Taguchi, M., Kakizaki, T., Hamada, N., Suzuki, M., Furusawa, Y., Watanabe, H., Kiguchi, K., and Kobayashi, Y. (2008). Heavy-ion microbeam system at JAEA-takasaki for microbeam biology. J Radiat Res (Tokyo), 49(1) :71–82.
- Gardès-Albert, Bonnefont-Rousselot, A. J. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique, 269-270. Disponible sur internet, <http://ist.inserm.fr/basisdiaggen/AC/2003-11-12/Gardes.pdf>.
- Garewal, H. S., Ramsey, L., Kaugars, G., and Boyle, J. (1993). Clinical experience with the micronucleus assay. J Cell Biochem Suppl, 17F :206–212.
- Gault, N., Rigaud, O., Poncy, J.-L., and Lefaix, J.-L. (2007). Biochemical alterations in human cells irradiated with alpha particles delivered by macro- or microbeams. Radiat Res, 167(5) :551–562.
- Gerardi, S. (2006). A comparative review of charged particle microbeam facilities. Radiat Prot Dosimetry, 122(1-4) :285–291.
- Gerardi, S., Galeazzi, G., and Cherubini, R. (2004). Progress report on the INFN-LNL horizontal single-ion microbeam facility. Radiat Res, 161(1) :93–94.
- Gerardi, S., Galeazzi, G., and Cherubini, R. (2005). A microcollimated ion beam facility for investigations of the effects of low-dose radiation. Radiat Res, 164(4 Pt 2) :586–590.
- Gerashchenko, B. I. and Howell, R. W. (2005). Bystander cell proliferation is modulated by the number of adjacent cells that were exposed to ionizing radiation. Cytometry A, 66(1) :62–70.
- Golub, T., Wacha, S., and Caroni, P. (2004). Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. Curr Opin Neurobiol, 14(5) :542–550.
- Gray, L. H. (1954). Conditions which affect the biologic damage resulting from exposure to radiation. Acta radiol, 41(1) :63–83.
- Greif, K., Brede, H., Frankenberg, D., and Giesen, U. (2004). The PTB single ion microbeam for irradiation of living cells. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 217(3) :505–512.

- Hafer, K., Iwamoto, K. S., and Schiestl, R. H. (2008). Refinement of the dichlorofluorescein assay for flow cytometric measurement of reactive oxygen species in irradiated and bystander cell populations. Radiat Res, 169(4) :460–468.
- Haimovitz-Friedman, A., Kan, C. C., Ehleiter, D., Persaud, R. S., McLoughlin, M., Fuks, Z., and Kolesnick, R. N. (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. J Exp Med, 180(2) :525–535.
- Hall, E. J. and Giaccia, A. (2006). Radiobiology for the radiobiologist. Lippincott Williams and Wilkins.
- Hall, E. J. and Hei, T. K. (2003). Genomic instability and bystander effects induced by high-LET radiation. Oncogene, 22(45) :7034–7042.
- Halliwell B., G. J. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press.
- Hamada, N., Ni, M., Funayama, T., Sakashita, T., and Kobayashi, Y. (2008). Temporally distinct response of irradiated normal human fibroblasts and their bystander cells to energetic heavy ions. Mutat Res, 639(1-2) :35–44.
- Hanzal-Bayer, M. F. and Hancock, J. F. (2007). Lipid rafts and membrane traffic. FEBS Lett, 581(11) :2098–2104.
- Heiss, M., Fischer, B., and Cholewa, M. (2004). Status of the GSI microbeam facility for cell irradiation with single ions. Radiat Res, 161(1) :98–99.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. Nature, 407(6805) :770–776.
- Hill, M. A., Stevens, D. L., Kadhim, M., Blake-James, M., Mill, A. J., and Goodhead, D. T. (2006). Experimental techniques for studying bystander effects in vitro by high and low-LET ionising radiation. Radiat Prot Dosimetry, 122(1-4) :260–265.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature, 411(6835) :366–374.
- Houtsmuller, A. B., Rademakers, S., Nigg, A. L., Hoogstraten, D., Hoeijmakers, J. H., and Vermeulen, W. (1999). Action of DNA repair endonuclease ercc1/xpf in living cells. Science, 284(5416) :958–961.
- Hu, B., Wu, L., Han, W., Zhang, L., Chen, S., Xu, A., Hei, T. K., and Yu, Z. (2006). The time and spatial effects of bystander response in mammalian cells induced by low dose radiation. Carcinogenesis, 27(2) :245–251.
- Huo, L., Nagasawa, H., and Little, J. B. (2001). HPRT mutants induced in bystander cells by very low fluences of alpha particles result primarily from point mutations. Radiat Res, 156(5 Pt 1) :521–525.
- Iliakis, G. (1997). Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. Semin Oncol, 24(6) :602–615.

-
- Iyer, R., Lehnert, B. E., and Svensson, R. (2000). Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles. Cancer Res, 60(5) :1290–1298.
- Joshi, G., Nelson, W., Revell, S., and Shaw, C. (1982). Discrimination of slow growth from non survival among small colonies of diploid syrian hamster cells after chromosome damage induced by a range of x ray doses. Int J Radiat Biol, 42(3) :283–296.
- Kadhim, M. A., Macdonald, D. A., Goodhead, D. T., Lorimore, S. A., Marsden, S. J., and Wright, E. G. (1992). Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation. Nature, 355(6362) :738–740.
- Kaplan, M. I., Limoli, C. L., and Morgan, W. F. (1997). Perpetuating radiation-induced chromosomal instability. Radiat Oncol Investig, 5(3) :124–128.
- Kartsogiannis, V. and Ng, K. (2004). Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. Molecular and cellular endocrinology, 228(1-2) :79–102.
- Kashino, G., Prise, K. M., Schettino, G., Folkard, M., Vojnovic, B., Michael, B. D., Suzuki, K., Kodama, S., and Watanabe, M. (2004). Evidence for induction of DNA double strand breaks in the bystander response to targeted soft x-rays in cho cells. Mutat Res, 556(1-2) :209–215.
- Kashino, G., Prise, K. M., Suzuki, K., Matsuda, N., Kodama, S., Suzuki, M., Nagata, K., Kinashi, Y., Masunaga, S.-I., Ono, K., and Watanabe, M. (2007). Effective suppression of bystander effects by DMSO treatment of irradiated cho cells. J of Radiat Res, 48(4) :327–333.
- Kellerer, A. M. (1972). An algorithm for LET-analysis. Phys Med Biol, 17(2) :232–240.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 26(4) :239–257.
- Khanna, K. K. and Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks : signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet, 27(3) :247–254.
- Khodja, H., Berthoumieux, E., Daudin, L., and Gallien, J. (2001). The pierre sue laboratory nuclear microprobe as a multi-disciplinary analysis tool. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 181 :83–86.
- Khodja, H., Daudin, L., Hanot, M., Hoarau, J., Carriere, M., and Gouget, B. (2006). The LPS saclay single-ion microbeam facility. Radiat Res, 166(4) :670–671.
- Kobayashi, Y., Funayama, T., Wada, S., Taguchi, M., and Watanabe, H. (2003). Irradiation of single mammalian cells with a precise number of energetic heavy ions - applications of microbeams for studying cellular radiation response. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 210 :308–311.

- Konopacka, M. and Rzeszowska-Wolny, J. (2006). The bystander effect-induced formation of micronucleated cells is inhibited by antioxidants, but the parallel induction of apoptosis and loss of viability are not affected. Mutat Res, 593(1-2) :32–38.
- Koturbash, I., Rugo, R. E., Hendricks, C. A., Loree, J., Thibault, B., Kutanzi, K., Pogribny, I., Yanch, J. C., Engelward, B. P., and Kovalchuk, O. (2006). Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue in vivo. Oncogene, 25(31) :4267–4275.
- Kronenberg, A. (1994). Radiation-induced genomic instability. Int J Radiat Biol, 66(5) :603–609.
- Laethem, A. V., Nys, K., Kelst, S. V., Claerhout, S., Ichijo, H., Vandenheede, J. R., Garmyn, M., and Agostinis, P. (2006). Apoptosis signal regulating kinase-1 connects reactive oxygen species to p38 mapk-induced mitochondrial apoptosis in uvb-irradiated human keratinocytes. Free Radic Biol Med, 41(9) :1361–1371.
- Lau, P. Hellweg, C. E. K. S. B.-K. C. (2005). Induction of DNA-strand breaks after x-irradiation in murine bone cells of various differentiation capacities. Space Life Sciences : Aircraft and Space Radiation Environment, 36 :1689–1695.
- Lea, D. (1962). Actions of Radiations on Living Cells. 2nd edn. Cambridge University Press.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S. C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol, 5(2) :227–231.
- Lehnert, B. E. and Goodwin, E. H. (1997). A new mechanism for DNA alterations induced by alpha particles such as those emitted by radon and radon progeny. Environ Health Perspect, 105 Suppl 5 :1095–1101.
- Li, P.-L., Zhang, Y., and Yi, F. (2007). Lipid raft redox signaling platforms in endothelial dysfunction. Antioxid Redox Signal, 9(9) :1457–1470.
- Limoli, C. L., Corcoran, J. J., Jordan, R., Morgan, W. F., and Schwartz, J. L. (2001). A role for chromosomal instability in the development of and selection for radioresistant cell variants. Br J Cancer, 84(4) :489–492.
- Little, J. B. (2000). Radiation carcinogenesis. Carcinogenesis, 21(3) :397–404.
- Little, J. B. (2003). Genomic instability and bystander effects : a historical perspective. Oncogene, 22(45) :6978–6987.
- Little, J. B. (2006). Cellular radiation effects and the bystander response. Mutat Res, 597(1-2) :113–118.
- Little, J. B., Azzam, E. I., de Toledo, S. M., and Nagasawa, H. (2002). Bystander effects : intercellular transmission of radiation damage signals. Radiat Prot Dosimetry, 99(1-4) :159–162.

-
- Little, J. B., Nagasawa, H., Li, G. C., and Chen, D. J. (2003). Involvement of the non-homologous end joining DNA repair pathway in the bystander effect for chromosomal aberrations. Radiat Res, 159(2) :262–267.
- Loeb, L. A. and Preston, B. D. (1986). Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. Annu Rev Genet, 20 :201–230.
- Lorimore, S. A., Coates, P. J., Scobie, G. E., Milne, G., and Wright, E. G. (2001). Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo : a mechanism for radiation-induced bystander effects ? Oncogene, 20(48) :7085–7095.
- Loura, L. M., Castanho, M. A., Fedorov, A., and Prieto, M. (2001). A photophysical study of the polyene antibiotic filipin. self-aggregation and filipin–ergosterol interaction. Biochim Biophys Acta, 1510(1-2) :125–135.
- Lyng, F. M., Maguire, P., Kilmurray, N., Mothersill, C., Shao, C., Folkard, M., and Prise, K. M. (2006a). Apoptosis is initiated in human keratinocytes exposed to signalling factors from microbeam irradiated cells. Int J Radiat Biol, 82(6) :393–399.
- Lyng, F. M., Maguire, P., McClean, B., Seymour, C., and Mothersill, C. (2006b). The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects. Radiat Res, 165(4) :400–409.
- Lyng, F. M., Seymour, C. B., and Mothersill, C. (2000). Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. Br J Cancer, 83(9) :1223–1230.
- Lyng, F. M., Seymour, C. B., and Mothersill, C. (2002a). Early events in the apoptotic cascade initiated in cells treated with medium from the progeny of irradiated cells. Radiat Prot Dosimetry, 99(1-4) :169–172.
- Lyng, F. M., Seymour, C. B., and Mothersill, C. (2002b). Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells : a possible mechanism for bystander-induced genomic instability ? Radiat Res, 157(4) :365–370.
- Marchetti, F., Coleman, M., Jones, I., and Wyrobek, A. (2006). Candidate protein bio-dosimeters of human exposure to ionizing radiation. Int J Radiat Biol, 82(9) :605–39.
- Martin, C. J. (2005). The LNT model provides the best approach for practical implementation of radiation protection. Br J Radiol, 78(925) :14–16.
- Matsumoto, H., Hayashi, S., Hatashita, M., Ohnishi, K., Shioura, H., Ohtsubo, T., Kitai, R., Ohnishi, T., and Kano, E. (2001). Induction of radioresistance by a nitric oxide-mediated bystander effect. Radiat Res, 155(3) :387–396.
- Medema, R. H., Klompaker, R., Smits, V. A., and Rijksen, G. (1998). p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. Oncogene, 16(4) :431–441.

- Meyn, M. S. (1995). Ataxia-telangiectasia and cellular responses to DNA damage. Cancer Res, 55(24) :5991–6001.
- Milgram, S. (2008). Effets cytotoxiques et phénotypiques de l'uranium et du plomb sur des modèles cellulaires ostéoblastiques. Effets cytotoxiques et phénotypiques de l'uranium et du plomb sur des modèles cellulaires ostéoblastiques. Université Jean Monnet, Saint-Etienne.
- Morgan, W. (2003a). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation : I. radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. Radiat Res, 159(5) :567–580.
- Morgan, W. and Sowa, M. (2005). Effects of ionizing radiation in non irradiated cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(40) :14127–14128.
- Morgan, W. F. (2003b). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation : II. radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. Radiat Res, 159(5) :581–596.
- Morgan, W. F., Day, J. P., Kaplan, M. I., McGhee, E. M., and Limoli, C. L. (1996). Genomic instability induced by ionizing radiation. Radiat Res, 146(3) :247–258.
- Morgan, W. F. and Sowa, M. B. (2007). Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. Mutat Res, 616(1-2) :159–164.
- Mothersill, C. and Seymour, C. (1997a). Lethal mutations and genomic instability. Int J Radiat Biol, 71(6) :751–758.
- Mothersill, C. and Seymour, C. (1997b). Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. Int J Radiat Biol, 71(4) :421–427.
- Mothersill, C. and Seymour, C. (2006a). Radiation-induced bystander and other non-targeted effects : novel intervention points in cancer therapy ? Curr Cancer Drug Targets, 6(5) :447–454.
- Mothersill, C. and Seymour, C. B. (2006b). Actions of radiation on living cells in the "post-bystander" era. EXS, (96) :159–177.
- Mothersill, C. and Seymour, C. B. (2006c). Radiation-induced bystander effects and the DNA paradigm : an "out of field" perspective. Mutat Res, 597(1-2) :5–10.
- Mothersill, C., Seymour, R. J., and Seymour, C. B. (2004). Bystander effects in repair-deficient cell lines. Radiat Res, 161(3) :256–263.
- Murphy, J. E. J., Nugent, S., Seymour, C., and Mothersill, C. (2005). Mitochondrial DNA point mutations and a novel deletion induced by direct low-LET radiation and by medium from irradiated cells. Mutat Res, 585(1-2) :127–136.

-
- Myhre, O., Andersen, J. M., Aarnes, H., and Fonnum, F. (2003). Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. Biochem Pharmacol, 65(10) :1575–1582.
- Nagasawa, H., Cremesti, A., Kolesnick, R., Fuks, Z., and Little, J. B. (2002). Involvement of membrane signaling in the bystander effect in irradiated cells. Cancer Res, 62(9) :2531–2534.
- Nagasawa, H., Huo, L., and Little, J. B. (2003). Increased bystander mutagenic effect in DNA double-strand break repair-deficient mammalian cells. Int J Radiat Biol, 79(1) :35–41.
- Nagasawa, H. and Little, J. B. (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. Cancer Res, 52(22) :6394–6396.
- Nagasawa, H. and Little, J. B. (1999). Unexpected sensitivity to the induction of mutations by very low doses of alpha-particle radiation : evidence for a bystander effect. Radiat Res, 152(5) :552–557.
- Nagasawa, H. and Little, J. B. (2002). Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wild-type and repair deficient cho cells by low fluences of alpha particles. Mutat Res, 508(1-2) :121–129.
- Nagasawa, H., Peng, Y., Wilson, P. F., Lio, Y.-C., Chen, D. J., Bedford, J. S., and Little, J. B. (2005). Role of homologous recombination in the alpha-particle-induced bystander effect for sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. Radiat Res, 164(2) :141–147.
- Nagasawa, H., Wilson, P. F., Chen, D. J., Thompson, L. H., Bedford, J. S., and Little, J. B. (2008). Low doses of alpha particles do not induce sister chromatid exchanges in bystander chinese hamster cells defective in homologous recombination. DNA Repair (Amst), 7(3) :515–522.
- Nakano, T., Morishita, S., Terato, H., Pack, S. P., Makino, K., and Ide, H. (2007). Repair mechanism of DNA-protein cross-link damage in escherichia coli. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf), (51) :213–214.
- Narayanan, P. K., Goodwin, E. H., and Lehnert, B. E. (1997). Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. Cancer Res, 57(18) :3963–3971.
- Narayanan, P. K., LaRue, K. E., Goodwin, E. H., and Lehnert, B. E. (1999). Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells. Radiat Res, 152(1) :57–63.
- Nikjoo, H., Oneill, P., Terrissol, M., and Goodhead, D. (1994). Modeling of radiation-induced DNA damage - the early physical and chemical event. Int J Radiat Biol, 66(5) :453–457.

- Nilsson, C., Pallon, J., Thungstrom, G., Arteaga, N., Auzelyte, V., Elfman, M., Kristiansson, P., Nilsson, C., and Wegden, M. (2006). Evaluation of a pre-cell hit detector for the future single ion hit facility in lund. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 249 :924–927.
- Nugent, S. M. E., Mothersill, C. E., Seymour, C., McClean, B., Lyng, F. M., and Murphy, J. E. J. (2007). Increased mitochondrial mass in cells with functionally compromised mitochondria after exposure to both direct gamma radiation and bystander factors. Radiat Res, 168(1) :134–142.
- Page, F. L., Kwoh, E. E., Avrutsкая, A., Gentil, A., Leadon, S. A., Sarasin, A., and Cooper, P. K. (2000). Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine : requirement for xpg, tfiih, and csb and implications for cockayne syndrome. Cell, 101(2) :159–171.
- Paquette, B. and Little, J. B. (1994). In vivo enhancement of genomic instability in minisatellite sequences of mouse c3h/10t1/2 cells transformed in vitro by x-rays. Cancer Res, 54(12) :3173–3178.
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. Curr Biol, 10(15) :886–895.
- Petrini, J. H. (2000). The mre11 complex and ATM : collaborating to navigate s phase. Curr Opin Cell Biol, 12(3) :293–296.
- Pfeiffer, P. (1998). The mutagenic potential of DNA double-strand break repair. Toxicology letters, 96-7 :119–129.
- Pilch, D. R., Sedelnikova, O. A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A., and Bonner, W. M. (2003). Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. Biochem Cell Biol, 81(3) :123–129.
- Pollycove, M. and Feinendegen, L. (2003). Radiation-induced versus endogenous DNA damage : possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage. Hum Exp Toxicol, 22(6) :290–306.
- Ponnaiya, B., Jenkins-Baker, G., Brenner, D. J., Hall, E. J., Randers-Pehrson, G., and Geard, C. R. (2004). Biological responses in known bystander cells relative to known microbeam-irradiated cells. Radiat Res, 162(4) :426–432.
- Portess, D. I., Bauer, G., Hill, M. A., and O'Neill, P. (2007). Low-dose irradiation of non-transformed cells stimulates the selective removal of precancerous cells via intercellular induction of apoptosis. Cancer Res, 67(3) :1246–1253.
- Powers, E. L. (1962). Considerations of survival curves and target theory. Phys Med Biol, 7 :3–28.
- Preston, R. J. (2003). The LNT model is the best we can do–today. J Radiol Prot, 23(3) :263–268.

-
- Prise, K. (1994). Use of radiation quality as a probe for DNA lesion complexity. Int J Radiat Biol., 65(1) :43–8.
- Prise, K. M., Belyakov, O. V., Folkard, M., and Michael, B. D. (1998). Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. Int J Radiat Biol, 74(6) :793–798.
- Prise, K. M., Schettino, G., Folkard, M., and Held, K. D. (2005). New insights on cell death from radiation exposure. Lancet Oncol, 6(7) :520–528.
- Proceedings (2006). Extended abstracts : Proceedings of the 7th international workshop : Microbeam probes of cellular radiation response - columbia university, new york, new york, march 15-17, 2006. Radiat Res, 166(4) :654.
- Puck, M. (1956). Action of x-rays on mammalian cells. J. Exp. Med., 103 :653–666.
- Ragnar, H. R. (2005). Electrostatic Accelerators : Fundamentals and Applications. N.Y.
- Ramakrishnan, N., McClain, D. E., and Catravas, G. N. (1993). Membranes as sensitive targets in thymocyte apoptosis. Int J Radiat Biol, 63(6) :693–701.
- Randers-Pehrson, G., Geard, C., Johnson, G., Elliston, C., and Brenner, D. (2001). The columbia university single-ion microbeam. Radiat Res, 156(2) :210–214.
- Reed, J. C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol, 124(1-2) :1–6.
- Regulus, P., Duroux, B., Baylet, P.-A., Favier, A., Cadet, J., and Ravanat, J.-L. (2007). Oxidation of the sugar radiation or bleomycin of a cluster DNA lesion moiety of DNA by ionizing could induce the formation. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(35) :14032–14037.
- Reinert, T., Fiedler, A., Skopek, J., Tanner, J., Vogt, J., and Butz, T. (2004). Single ion bombardment of living cells at LIPSION. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 219-20 :77–81.
- Rigaud, O. and Moustacchi, E. (1996). Radioadaptation for gene mutation and the possible molecular mechanisms of the adaptive response. Mutat Res, 358(2) :127–134.
- Rothkamm, K. and Lobrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(9) :5057–5062.
- Rotman, G. and Shiloh, Y. (1998). ATM : from gene to function. Hum Mol Genet, 7(10) :1555–1563.
- Rotman, G. and Shiloh, Y. (1999). ATM : a mediator of multiple responses to genotoxic stress. Oncogene, 18(45) :6135–6144.
- Rydberg, B. (2001). Radiation-induced DNA damage and chromatin structure. Acta Oncol, 40(6) :682–685.

- Sabatier, L., Lebeau, J., and Dutrillaux, B. (1994). Chromosomal instability and alterations of telomeric repeats in irradiated human fibroblasts. Int J Radiat Biol, 66(5) :611–613.
- Savage, J. R. K. (2002). Reflections and meditations upon complex chromosomal exchanges. Mutat Res, 512(2-3) :93–109.
- Schettino, G., Folkard, M., Prise, K. M., Vojnovic, B., Held, K. D., and Michael, B. D. (2003). Low-dose studies of bystander cell killing with targeted soft x rays. Radiat Res, 160(5) :505–511.
- Schiller, P. C., D’Ippolito, G., Balkan, W., Roos, B. A., and Howard, G. A. (2001). Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. Bone, 28(4) :362–369.
- Sedelnikova, O. A., Nakamura, A., Kovalchuk, O., Koturbash, I., Mitchell, S. A., Marino, S. A., Brenner, D. J., and Bonner, W. M. (2007). DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. Cancer Res, 67(9) :4295–4302.
- Sengupta, P., Baird, B., and Holowka, D. (2007). Lipid rafts, fluid/fluid phase separation, and their relevance to plasma membrane structure and function. Semin Cell Dev Biol, 18(5) :583–590.
- Seymour, C. and Mothersill, C. (1999). Cell communication and the ”bystander effect”. Radiat Res, 151(4) :505–506.
- Shao, C., Folkard, M., Michael, B. D., and Prise, K. M. (2004). Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(37) :13495–13500.
- Shao, C., Folkard, M., and Prise, K. M. (2008a). Role of tgf-beta1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells. Oncogene, 27(4) :434–440.
- Shao, C., Furusawa, Y., Aoki, M., and Ando, K. (2003a). Role of gap junctional intercellular communication in radiation-induced bystander effects in human fibroblasts. Radiat Res, 160(3) :318–323.
- Shao, C., Furusawa, Y., Aoki, M., Matsumoto, H., and Ando, K. (2002). Nitric oxide-mediated bystander effect induced by heavy-ions in human salivary gland tumour cells. Int J Radiat Biol, 78(9) :837–844.
- Shao, C., Furusawa, Y., Kobayashi, Y., and Funayama, T. (2006a). Involvement of gap junctional intercellular communication in the bystander effect induced by broad-beam or microbeam heavy ions. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 251(1) :177–181.

-
- Shao, C., Furusawa, Y., Kobayashi, Y., Funayama, T., and Wada, S. (2003b). Bystander effect induced by counted high-LET particles in confluent human fibroblasts : a mechanistic study. FASEB J, 17(11) :1422–1427.
- Shao, C., Lyng, F. M., Folkard, M., and Prise, K. M. (2006b). Calcium fluxes modulate the radiation-induced bystander responses in targeted glioma and fibroblast cells. Radiat Res, 166(3) :479–487.
- Shao, C., Prise, K. M., and Folkard, M. (2008b). Signaling factors for irradiated glioma cells induced bystander responses in fibroblasts. Mutat Res, 638(1-2) :139–145.
- Shao, C., Stewart, V., Folkard, M., Michael, B. D., and Prise, K. M. (2003c). Nitric oxide-mediated signaling in the bystander response of individually targeted glioma cells. Cancer Res, 63(23) :8437–8442.
- Shao, D., Segal, A. W., and Dekker, L. V. (2003d). Lipid rafts determine efficiency of nadph oxidase activation in neutrophils. FEBS Lett, 550(1-3) :101–106.
- Shariff, A., Auzelyte, V., Elfman, M., Kristiansson, P., Malmqvist, K., Nilsson, C., Pallon, J., and Wegden, M. (2005a). The lund nuclear microprobe sub-micron set-up. part i : Ion optics calculation. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 231(Sp. Iss. SI) :1–6.
- Shariff, A., Nilsson, C., Auzelyte, V., Elfman, M., Kristiansson, P., Malmqvist, K., Pallon, J., and Wegden, M. (2005b). The lund nuclear microprobe sub-micron set-up. part ii : Beam line, focusing system and scanning. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 231(Sp. Iss. SI) :7–13.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. Nature, 387(6633) :569–572.
- Sinclair, W. (1964). X ray induced heritable damage (small colony formation) in cultured mammalian cells. Radiat Res, 21(4) :584–90.
- Sinha, R. P. and Heder, D. P. (2002). Uv-induced DNA damage and repair : a review. Photochem Photobiol Sci, 1(4) :225–236.
- Sokolov, M. V., Smilenov, L. B., Hall, E. J., Panyutin, I. G., Bonner, W. M., and Sedelnikova, O. A. (2005). Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. Oncogene, 24(49) :7257–7265.
- Somogyi, Z. (2000). Radiation response of cell organelles. Micron, 31(2) :165–181.
- Stojic, L., Brun, R., and Jiricny, J. (2004). Mismatch repair and DNA damage signalling. DNA Repair (Amst), 3(8-9) :1091–1101.
- Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2001). A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. Genes Dev, 15(5) :507–521.

- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H. G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1997). The central executioner of apoptosis : multiple connections between protease activation and mitochondria in fas/apo-1/cd95- and ceramide-induced apoptosis. J Exp Med, 186(1) :25–37.
- Sutherland, B. M., Bennett, P. V., Sidorkina, O., and Laval, J. (2000). Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation : oxidized bases and strand breaks. Biochemistry, 39(27) :8026–8031.
- Suzuki, M., Zhou, H., Geard, C. R., and Hei, T. K. (2004). Effect of medium on chromatin damage in bystander mammalian cells. Radiat Res, 162(3) :264–269.
- Szumiel, I. (2003). The bystander effect : is reactive oxygen species the driver ? Nukleonika, 48(3) :113–120.
- Szumiel, I., Kapiszewska, M., Kruszewski, M., Iwanenko, T., and Lange, C. S. (1995). Content of iron and copper in the nuclei and induction of ph 9-labile lesions in 15178y sublines inversely cross-sensitive to H₂O₂ and x-rays. Radiat Environ Biophys, 34(2) :113–119.
- Tapio, S. and Jacob, V. (2007). Radioadaptive response revisited. Radiat Environ Biophys, 46(1) :1–12.
- Tartier, L., Gilchrist, S., Burdak-Rothkamm, S., Folkard, M., and Prise, K. M. (2007). Cytoplasmic irradiation induces mitochondrial-dependent 53bp1 protein relocalization in irradiated and bystander cells. Cancer Res, 67(12) :5872–5879.
- Teyssier F, Bay JO, D. C. V. P. (1999). Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation. Bull Cancer, 86(4) :345–57.
- Thannickal, V. J., Aldweib, K. D., and Fanburg, B. L. (1998). Tyrosine phosphorylation regulates H₂O₂ production in lung fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1. J Biol Chem, 273(36) :23611–23615.
- Thannickal, V. J., Day, R. M., Klinz, S. G., Bastien, M. C., Larios, J. M., and Fanburg, B. L. (2000). Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and tgf-beta1. FASEB J, 14(12) :1741–1748.
- Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. (1995). Activation of an H₂O₂-generating nadh oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. J Biol Chem, 270(51) :30334–30338.
- Timofeeff-Ressovsky, Z. (1947). Das Trefferprinzip in der Biologie. S. Herzel Verlag.
- Todd, P. (1968). Defective mammalian cells isolated from x ray irradiated cultures. Mutat Res, 5(1) :173–78.

-
- Tomizawa, S., Imai, H., Tsukada, S., Simizu, T., Honda, F., Nakamura, M., Nagano, T., Urano, Y., Matsuoka, Y., Fukasaku, N., and Saito, N. (2005). The detection and quantification of highly reactive oxygen species using the novel hpf fluorescence probe in a rat model of focal cerebral ischemia. Neurosci Res, 53(3) :304–313.
- Uretz, R. B., Bloom, W., and Zirkle, R. E. (1954). Irradiation of parts of individual cells. ii. effects of an ultraviolet microbeam focused on parts of chromosomes. Science, 120(3110) :197–199.
- Valerie, K., Yacoub, A., Hagan, M. P., Curiel, D. T., Fisher, P. B., Grant, S., and Dent, P. (2007). Radiation-induced cell signaling : inside-out and outside-in. Mol Cancer Ther, 6(3).
- van Hoffen, A., Balajee, A. S., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. F. (2003). Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. Toxicology, 193(1-2) :79–90.
- Verheij, M., Ruiter, G. A., Zerp, S. F., van Blitterswijk, W. J., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., and Bartelink, H. (1998). The role of the stress-activated protein kinase (sapk/jnk) signaling pathway in radiation-induced apoptosis. Radiother Oncol, 47(3) :225–232.
- Verrelle (1998). L’apoptose radio-induite. Revue de l’ACOMEN, 4.
- Veselov, O., Lekki, J., Polak, W., Strivay, D., Stachura, Z., Lebed, K., and Styczen, J. (2005). The recognition of biological cells utilizing quantitative phase microscopy system. Nuclear instruments and methods in physics research section B - Beam interactions with materials and atoms, 231(Sp. Iss. SI) :212–217.
- Veselov, O., Polak, W., Ugenskiene, R., Lebed, K., Lekki, J., Stachura, Z., and Styczen, J. (2006). Development of the ifj single ion hit facility for cell irradiation. Radiat Prot Dosimetry, 122(1-4) :316–319.
- Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H., and Franceschi, R. T. (1999). Isolation and characterization of mc3t3-e1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. J Bone Miner Res, 14(6) :893–903.
- Wang, D., Kreutzer, D. A., and Essigmann, J. M. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage : insights from studies using defined lesions. Mutat Res, 400(1-2) :99–115.
- Wang, X.-Q. and Paller, A. S. (2006). Lipid rafts : membrane triage centers. J Invest Dermatol, 126(5) :951–953.
- Ward, J. F. (1997). Nature of lesions formed by ionizing radiation., volume II. DNA Damage and Repair : Biochemistry, Genetics, and Cell Biology.

- Watson, G. E., Lorimore, S. A., Clutton, S. M., Kadhim, M. A., and Wright, E. G. (1997). Genetic factors influencing alpha-particle-induced chromosomal instability. Int J Radiat Biol, 71(5) :497–503.
- Whitehouse, C. J., Taylor, R. M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D. D., Weinfeld, M., and Caldecott, K. W. (2001). Xrcc1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. Cell, 104(1) :107–117.
- Wright, E. G. (1998). Radiation-induced genomic instability in haemopoietic cells. Int J Radiat Biol, 74(6) :681–687.
- Wright, E. G. (1999). Inherited and inducible chromosomal instability : a fragile bridge between genome integrity mechanisms and tumourigenesis. J Pathol, 187(1) :19–27.
- Wu, L. J., Randers-Pehrson, G., Xu, A., Waldren, C. A., Geard, C. R., Yu, Z., and Hei, T. K. (1999). Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(9) :4959–4964.
- Yang, H., Asaad, N., and Held, K. D. (2005). Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of x-ray-irradiated normal human fibroblasts. Oncogene, 24(12) :2096–2103.
- Yasui, L. S., Chen, K., Wang, K., Jones, T. P., Caldwell, J., Guse, D., and Kassis, A. I. (2007). Using hoechst 33342 to target radioactivity to the cell nucleus. Radiat Res, 167(2) :167–175.
- Zhan, Q., Carrier, F., and Fornace, A. J. (1993). Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. Mol Cell Biol, 13(7) :4242–4250.
- Zhou, B. B. and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response : putting checkpoints in perspective. Nature, 408(6811) :433–439.
- Zhou, H., Ivanov, V. N., Lien, Y.-C., Davidson, M., and Hei, T. K. (2008). Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation-induced bystander effects. Cancer Res, 68(7) :2233–2240.
- Zhou, H., Randers-Pehrson, G., Waldren, C. A., Vannais, D., Hall, E. J., and Hei, T. K. (2000). Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(5) :2099–2104.
- Zhou, H., Suzuki, M., Gillispie, J., Randers-Pehrson, G., and Hei, T. K. (2006). Cytoplasmic radiation-induced bystander mutagenesis. Radiat Res, 166(4) :689.
- Zhou, H., Suzuki, M., Randers-Pehrson, G., Vannais, D., Chen, G., Trosko, J. E., Waldren, C. A., and Hei, T. K. (2001). Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(25) :14410–14415.
- Zirkle, R. E. and Bloom, W. (1953). Irradiation of parts of individual cells. Science, 117(3045) :487–493.

Résumé L'effet de voisinage radio-induit s'observe dans les cellules voisines de cellules irradiées mais non directement touchées par l'irradiation. A ce jour, les radicaux libres sont considérés comme ayant un rôle actif dans la survenue de réponse au voisinage, mais leur implication n'est pas encore totalement définie. Afin de déterminer leur impact dans la réponse au voisinage, à la fois temporellement et spatialement, des irradiations par microfaisceau de particules α sont mises au point afin de cibler une fraction définie de cellules au niveau du noyau dans une culture cellulaire. Les irradiations sont pratiquées sur des cellules normales ostéoblastiques à sous-confluence nommées MC3T3-E1. Deux sources distinctes sont identifiées dans les cellules comme productrices d'espèces réactives de l'oxygène après irradiation ciblée : la membrane cytoplasmique et les mitochondries. L'inhibition du stress oxydatif général observé après irradiation par la filipin (détruisant les radeaux lipidiques) met en évidence le rôle premier de la membrane dans la survenue d'effet de voisinage. Les conséquences cellulaires de l'effet de voisinage sont aussi étudiées à l'échelle de la cellule en termes de mort cellulaire et induction de micronoyaux. Une fraction de 10 à 100% de cellules est individuellement ciblée dans la population cellulaire. Dans ce cas, l'induction de mort mitotique et de micronoyaux augmentent dans les cellules voisines, ainsi que dans les cellules directement irradiées. Ces observations démontrent un impact de l'effet de voisinage entre cellules irradiées selon un mode autocrine ou paracrine. Cette étude indique une interaction complexe entre signaux relatifs à l'irradiation et signaux relatifs à l'effet de voisinage (dépendant de la membrane) conduisant à une amplification de la réponse cellulaire originelle.

Mots-clés Effet de voisinage, irradiation par microfaisceau, espèces réactives de l'oxygène.

Abstract Ionizing radiation-induced bystander effects arise in bystander cells that receive signals from directly irradiated cells. To date, free radicals are believed to play an active role in the bystander response, but this is incompletely characterized. To mark temporal and spatial impacts of bystander effect, we employed a precise α -particle microbeam to target a small fraction of sub-confluent osteoblastic cell cultures (MC3T3-E1). We identified the cellular membrane and mitochondria like two distinct places generating reactive oxygen species. The global oxidative stress observed after irradiation was significantly attenuated after filipin treatment, evidencing the pivotal role of membrane in MC3T3-E1 cells bystander response. To determine impact of bystander effect at a cell level, cellular consequences of this membrane-dependant bystander effect were then investigated. A variable fraction of the cell population (10 to 100%) was individually targeted. In this case, mitotic death and micronuclei yield both increased in bystander cells as well as in targeted cells demonstrating a role of bystander signals between irradiated cells in an autocrine or paracrine manner. Our results indicate a complex interaction of direct irradiation and bystander signals that lead to a membrane-dependant amplification of cell responses.

Keywords Bystander effect, microbeam irradiation, reactive oxygen species.

